

UNIVERSITÀ DI PISA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE, ALIMENTARI E AGRO-  
AMBIENTALI

CORSO DI DOTTORATO IN

“SCIENZA DELLE PRODUZIONI VEGETALI”

(XXIV CICLO)

Presidente del Corso: Prof. Alberto Pardossi

**“OZONO E PIANTE MEDICINALI: IL CASO DELLA  
*MELISSA OFFICINALIS*”**

Dott.ssa Maria Giovanna Carucci

RELATORE: Prof.ssa Cristina Nali

Anno accademico 2011-2012



*“Every science begins as philosophy and ends as art”*

*Will Durant*



# INDICE DEGLI ARGOMENTI

<b>1.INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Generalità sull'ozono</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Ozono e vegetazione</b>	<b>4</b>
<i>1.2.1. Fitotossicità dell'ozono</i>	<b>5</b>
<i>1.2.2. La risposta delle piante all'ozono</i>	<b>14</b>
<i>1.2.3. Ozono come strumento per studiare la morte cellulare programmata</i>	<b>19</b>
<i>1.2.4. Interazioni tra le vie di segnalazione che influenzano la morte cellulare programmata</i>	<b>20</b>
<b>1.3. Piante medicinali e alterazione della qualità in risposta a condizioni di stress</b>	<b>23</b>
<b>1.4. Scopo del lavoro</b>	<b>29</b>
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	<b>31</b>
<b>2.1. Allevamento del materiale vegetale</b>	<b>31</b>
<b>2.2. Fumigazioni con ozono</b>	<b>31</b>
<i>2.2.1. Esposizioni puntiformi</i>	<b>31</b>
<i>2.2.2. Esposizioni croniche</i>	<b>32</b>
<b>2.3. Analisi dei sintomi fogliari</b>	<b>32</b>
<b>2.4. Verifica dell'integrità delle membrane</b>	<b>33</b>
<i>2.4.1. Analisi della perossidazione lipidica tramite saggio dell'acido tiobarbiturico</i>	<b>33</b>
<i>2.4.2. Conducibilità elettrica di porzioni fogliari</i>	<b>33</b>
<i>2.4.3. Contenuto idrico relativo di dischetti fogliari</i>	<b>34</b>
<b>2.5. Analisi eco fisiologiche</b>	<b>34</b>
<i>2.5.1. Scambi gassosi foto sintetici</i>	<b>34</b>
<i>2.5.2. Fluorescenza della clorofilla a</i>	<b>35</b>
<b>2.6. Estrazione e determinazione del contenuto in pigmenti fotosintetici</b>	<b>36</b>
<b>2.7. Contenuto in zuccheri solubili e amido</b>	<b>37</b>
<b>2.8. Vitalità cellulare e localizzazione <i>in situ</i> di acqua ossigenata</b>	<b>37</b>
<b>2.9. Determinazione del contenuto in acqua ossigenata e anione superossido</b>	<b>38</b>
<b>2.10. Determinazione dell'attività della superossido dismutasi</b>	<b>39</b>
<b>2.11. Determinazione del contenuto degli acidi salicilico e jasmonico</b>	<b>39</b>

2.12. Determinazione della produzione di etilene e acido abscissico	40
2.13. Determinazione della quantità di acido ascorbico e di glutathione	42
2.14. Determinazione dell'attività specifica dell'enzima fenilalanina ammonio liasi	43
2.15. Determinazione degli acidi fenolici e flavonoidi	43
2.16. Valutazione dell'espressione genica degli enzimi della via dell'acido rosmarinico	43
2.16.1. Isolamento e quantificazione dell'RNA totale	44
2.16.2. Sintesi del DNA complementare (cDNA)	45
2.16.3. Reazione a catena della polimerasi (PCR)	45
2.16.4. Elettroforesi su gel di agarosio	47
2.17. Biomassa e area fogliare	48
2.18. Estrazione dell'olio essenziale	48
2.19. Determinazione della capacità antiossidante totale dell'estratto vegetale	48
2.19.1. Saggio DPPH•	49
2.19.2. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)	49
2.19.3. Hydroxyl radical absorbance capacity (HORAC)	50
2.20. Analisi statistica dei dati	51
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	52
3.1. Episodio puntiforme	52
3.1.1. Risultati episodio puntiforme	52
3.1.2. Discussione episodio puntiforme	63
3.2. Esposizione cronica	71
3.2.1. Risultati esposizione cronica	71
3.2.2. Discussione esposizione cronica	92
4. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	99
5. BIBLIOGRAFIA	101
6. APPENDICE	130

## RIASSUNTO

L'ozono ( $O_3$ ) è un gas altamente reattivo composto da tre atomi di ossigeno che, in virtù del suo elevato potere ossidante, è considerato un inquinante estremamente dannoso, capace di attaccare direttamente matrici animali e vegetali, nonché materiali non biologici. Come evidenziato dai dati più recenti, derivati dal monitoraggio della qualità dell'aria, l'andamento generale della sua concentrazione è da tempo in continua e progressiva crescita e, date le sue modalità di formazione, esso si riscontra facilmente nell'area del bacino del Mediterraneo. I gravi danni che lo *smog* fotochimico (del quale l' $O_3$  è il principale componente) era capace di provocare agli organismi vegetali sono conosciuti sin dagli anni '50; ancora oggi però l'effetto dell' $O_3$  sulle piante medicinali è ancora poco studiato: solo un ridotto numero di specie è stato saggiato allo scopo di stabilirne il grado di sensibilità.

Obiettivo del lavoro è stato quello di verificare la risposta allo *stress* ossidativo di piante di *Melissa officinalis* (nota per le sue molteplici proprietà officinali), in modo da individuare quali possano essere le basi fisiologiche, biochimiche e molecolari responsabili dei meccanismi di suscettibilità/tolleranza.

A questo scopo l'indagine si è articolata in due fasi:

1) episodio puntiforme (200 ppb di  $O_3$ , 5 ore) in condizioni standardizzate, analizzando:

(i) effetti macroscopici, considerando che a 48 ore dall'inizio della fumigazione si è osservata la presenza di sintomi accompagnata da un'alterazione dell'integrità delle membrane;

(ii) *performance* fotosintetica mediante analisi *in vivo*, quali valutazione degli scambi gassosi e misure di fluorescenza della clorofilla *a*. Dalle prime indagini è emerso un sostanziale decremento nella capacità di assimilazione dell'anidride carbonica (-46,9% rispetto ai controlli) al termine della fumigazione e questo *trend* è stato confermato anche dalla riduzione dell'11,4% del parametro  $F_v/F_0$ , indicativo di una parziale inibizione del sito donatore;

(iii) biosintesi di molecole segnale, quali acidi salicilico, jasmonico ed etilene che hanno mostrato variazioni talvolta anche precoci, a conferma dell'avvenuta attivazione del meccanismo di trasduzione del segnale necessaria per la stimolazione di risposte secondarie a livello genico e metabolico;

(iv) produzione di specie reattive dell'ossigeno, con accumulo di acqua ossigenata già dopo un'ora dall'inizio del trattamento e anione superossido, che subisce una diminuzione pari a -55 e -63% rispettivamente a 1 e 5 ore dall'inizio della fumigazione. È stata, inoltre

valutata l'attività della superossido dismutasi che al termine della fumigazione mostra un marcato incremento pari al 196% .

(v) contenuto di molecole antiossidanti, con evidente accumulo di acido ascorbico (+148% al termine del periodo di *recovery*) e contemporanea riduzione del contenuto in  $\beta$ -carotene, per tutto il periodo analizzato;

2) esposizione cronica a livelli realistici di  $O_3$  (80 ppb, 5 h d<sup>-1</sup>) per 35 giorni consecutivi (maggio e giugno) fino allo stadio di fioritura, testando le risposte:

i) macroscopiche. È stata osservata la presenza di sintomi a 14 giorni dall'inizio della fumigazione accompagnata da un forte incremento della perossidazione delle membrane e accumulo di acqua ossigenata (+20% rispetto ai controlli). Sono stati inoltre, misurati i parametri di crescita e produttività che hanno mostrato un evidente calo al termine del periodo analizzato;

ii) ecofisiologiche, con valutazione della *performance* fotosintetica, mediante analisi relative alla fluorescenza della clorofilla *a* e agli scambi gassosi. Da queste ultime si è riscontrata una riduzione dei parametri  $A_{max}$  e  $G_w$ , rispettivamente pari a -44% e -36%, in piante trattate rispetto ai controlli;

iii) biochimiche, mediante l'analisi del contenuto in metaboliti primari, quali zuccheri solubili, che non subivano grosse variazioni a tutti i tempi studiati e amido che in seguito ad un precoce accumulo, subiva un forte calo (-46% rispetto ai controlli) all'ultimo tempo considerato. Analogo comportamento è stato riscontrato per il contenuto in pigmenti fotosintetici, mentre un forte incremento si è registrato nel contenuto in acido rosmarinico (+56% rispetto ai controlli) già dalla prima settimana di trattamento;

iv) molecolari, attraverso l'analisi dell'espressione dei trascritti di geni (PAL, 4CL, RAS) codificanti gli enzimi maggiormente coinvolti nel *pathway* biosintetico che porta alla formazione dell'acido rosmarinico (principale costituente dell'estratto di melissa). Da queste indagini è emerso un comportamento simile nell'espressione di 4CL e RAS, con un marcato incremento a 7 giorni dall'inizio del trattamento seguito da un successivo ritorno ai livelli costitutivi. PAL ha seguito una linea differente mostrando un leggero incremento del prodotto genico nei primi 7 giorni di analisi, per poi subire un forte decremento all'ultimo tempo analizzato.

Alla luce dei risultati ottenuti da entrambe le fasi analizzate, è possibile affermare che la melissa costituisce un bersaglio vulnerabile e sensibile all'azione tossica dell' $O_3$  in quanto, non solo si sono potute osservare manifestazioni sintomatiche evidenti (quali punteggiature necrotiche sulle lamine fogliari, alterazioni della biomassa e dei parametri di produttività), ma anche una serie di danni subliminali riconducibili essenzialmente ad un decremento



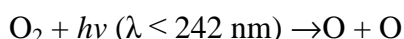
dell'attività fotosintetica e della carbofissazione e di contro una stimolazione del metabolismo secondario valutabile sia in termini di accumulo di metaboliti che di espressione genica.

## 1. INTRODUZIONE

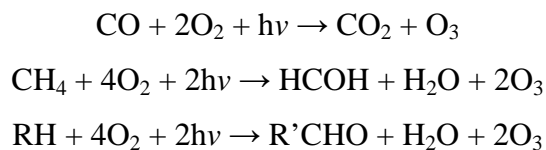
### 1.1. Generalità sull'ozono

Tra i vari inquinanti atmosferici, l'ozono (O<sub>3</sub>) risulta essere uno degli attori principali (Levy, 1971; Crutzen, 1973, 1974). Si tratta della forma allotropica triatomica dell'ossigeno (O<sub>2</sub>), di colore azzurrino, di odore agliaceo pungente (il limite di percezione olfattiva è circa 10 ppb; 1 ppb = 1,96 µg m<sup>-3</sup> in condizioni *standard* di temperatura e di pressione) e con un grande potenziale ossidoriduttivo (+2,07 V), in virtù del quale attacca direttamente matrici animali e vegetali, nonché materiali non biologici. Dal 1851 è nota la sua azione irritante a carico dei polmoni; ad esso vengono attribuiti ruoli primari anche nei numerosi casi di mortalità associati alle “ondate di calore” che spesso affliggono il nostro Paese in estate (Pellegrini *et al.*, 2007). Perciò questo inquinante è da tempo oggetto di interventi normativi in sede sia nazionale sia comunitaria.

Nella stratosfera, l'O<sub>3</sub> è presente per circa il 97% del totale e le molecole di questo gas assorbono le radiazioni ultraviolette (UV) a bassa lunghezza d'onda ( $\lambda < 242$  nm) emesse dal Sole, che sarebbero, a causa della loro azione mutagenica, dannose per la vita sulla Terra. La sua formazione nella stratosfera avviene attraverso la combinazione dell'ossigeno monoatomico (O), generato dalla fotolisi di O<sub>2</sub>, per azione dei raggi UV con l'O<sub>2</sub>, in presenza di una molecola (M) in grado di assorbire l'energia in eccesso della reazione (*meccanismo di Chapman*) (Chameides *et al.*, 1994):



A livello troposferico, l'O<sub>3</sub> è prodotto da una reazione in equilibrio O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>, che coinvolge gli ossidi di azoto (NO<sub>x</sub>) e la luce (Rao *et al.*, 2000), che porta alla formazione e alla distruzione, in uguale quantità, di O<sub>3</sub> e monossido di azoto (NO), in quello che prende il nome di “ciclo indisturbato del biossido di azoto (NO<sub>2</sub>)” (Figura 1A). Quando nella troposfera sono presenti anche specie chimicamente molto attive, gli idrocarburi ad esempio, il suddetto equilibrio viene spostato verso l'aumento dell'inquinante, attraverso la sottrazione diretta di NO a formare altri composti (Figura 1B), anch'essi inquinanti. Inoltre, la fotossidazione del monossido di carbonio (CO), la presenza di idrocarburi incombusti (come il metano), la formaldeide ed altre sostanze organiche non metaniche, possono contribuire alla formazione di O<sub>3</sub>, nell'ambito del cosiddetto “*smog* fotochimico” (Fishman *et al.*, 1985):



Possono anche verificarsi fenomeni di intrusione del gas negli strati più bassi grazie a scambi tra stratosfera e troposfera, che avvengono solo in particolari condizioni meteorologiche (Junge, 1962). Questi ed altri eventi, come le scariche elettriche durante i temporali, mantengono l'O<sub>3</sub> “al suolo” ad un livello di *background* naturale pari a 10-20 ppb.

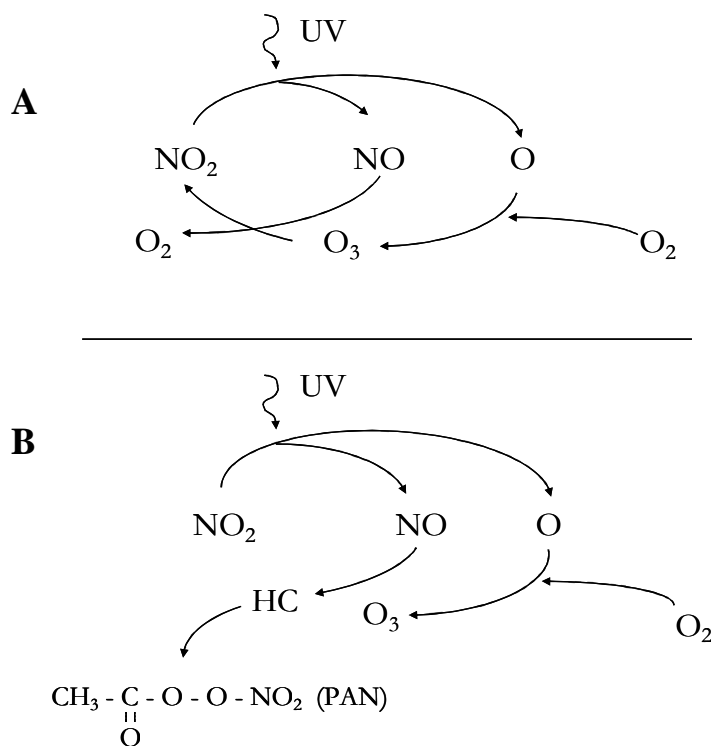


Figura 1 – A) Ciclo fotolitico indisturbato del biossido di azoto; B) interazione con gli idrocarburi a formare lo *smog* fotochimico (da Lorenzini e Nali, 2005).

Spesso i livelli più alti di contaminazione si registrano in prossimità di fonti di emissione, come nelle aree urbane e/o industriali, ma in conseguenza del fatto che la sintesi richiede un certo tempo e della facilità con la quale si spostano i precursori, è frequente il caso in cui la concentrazione di O<sub>3</sub> sia superiore in aree poste alcune decine di chilometri sotto vento rispetto ai centri urbani, che non negli agglomerati stessi. Inoltre, proprio nelle zone più

inquinare si verificano con maggiore intensità le reazioni che portano alla diminuzione dell'O<sub>3</sub> ("titolazione"), in particolare la combinazione con NO.

La possibilità di trasporto a lunghe distanze (anche diverse centinaia di chilometri) dei precursori e dello stesso O<sub>3</sub>, in aree remote, rurali e forestali (e in alto mare), è ben dimostrata. Ad esempio, la maggior parte dell'inquinante che si riscontra sull'isola di Creta trova la sua origine nella terraferma (Kouvarakis *et al.*, 2000). Situazione analoga è stata riscontrata a Tenerife (Isole Canarie) dove i venti, che hanno provenienza prevalente da nord-est, trasportano il contaminante da zone a latitudini nordiche, così da contribuire, insieme a quello prodotto sull'isola, agli alti livelli di AOT40 (*Accumulated exposure Over a Threshold of 40 ppb*) (Guerra *et al.*, 2004). Studi effettuati con tecniche di biomonitoraggio hanno evidenziato la presenza di significative concentrazioni dell'ossidante nelle isole minori dell'Arcipelago Toscano (Gorgona e Capraia), dove la produzione locale di precursori è irrilevante (Lorenzini *et al.*, 1995). Quindi, nonostante che la formazione di O<sub>3</sub> sia tipica delle aree urbane con elevata densità di traffico, questo inquinante è facilmente trasportato verso le zone suburbane e periferiche, con risvolti negativi sulla crescita e lo sviluppo di colture agricole, essenze forestali e vegetazione spontanea (Lefohn, 1992). I risultati di programmi di monitoraggio su scala internazionale hanno confermato che il problema non è di soluzione locale, ma necessita di un intervento su scala multi-regionale, attraverso piani di cooperazione.

Nel meccanismo di formazione dell'O<sub>3</sub> troposferico svolgono un ruolo fondamentale la componente antropogenica e quella meteorologica. Di conseguenza, questo inquinante è caratterizzato da una distribuzione geografica peculiare, strettamente legata alla concentrazione dei precursori ed alle condizioni atmosferiche (intensità della radiazione solare, elevata temperatura e stabilità atmosferica).

I profili giornalieri mostrano, infatti, un ben definito ritmo circadiano, caratterizzato da bassi livelli durante la notte e da un picco di concentrazione durante le ore centrali della giornata; esiste, poi, un'ampia variabilità stagionale con i periodi estivi maggiormente soggetti al rischio (Figura 2). Generalmente, più alti livelli di O<sub>3</sub> si registrano quando la temperatura dell'ambiente raggiunge valori compresi tra i 27 ed i 32 °C; in città situate ad altitudini elevate (ad esempio, Città del Messico), in cui la radiazione solare è più intensa, sono stati raggiunti notevoli livelli di concentrazione (> 300 ppb) anche a temperature inferiori (McKee, 1993). Alla luce di queste considerazioni, appare chiaro come il bacino del Mediterraneo, presentando estati calde e secche ed inverni miti, sia una regione ad alto rischio per lo *smog* fotochimico (Hidy e Mueller, 1986). Si possono avere elevate concentrazioni

anche di notte; i meccanismi che giustificano il fenomeno sono tre: (i) trasporto orizzontale da altre località; (ii) discesa dalla stratosfera; (iii) intrappolamento dell'O<sub>3</sub> durante il giorno in uno strato di inversione termica (Lorenzini e Nali, 2005).

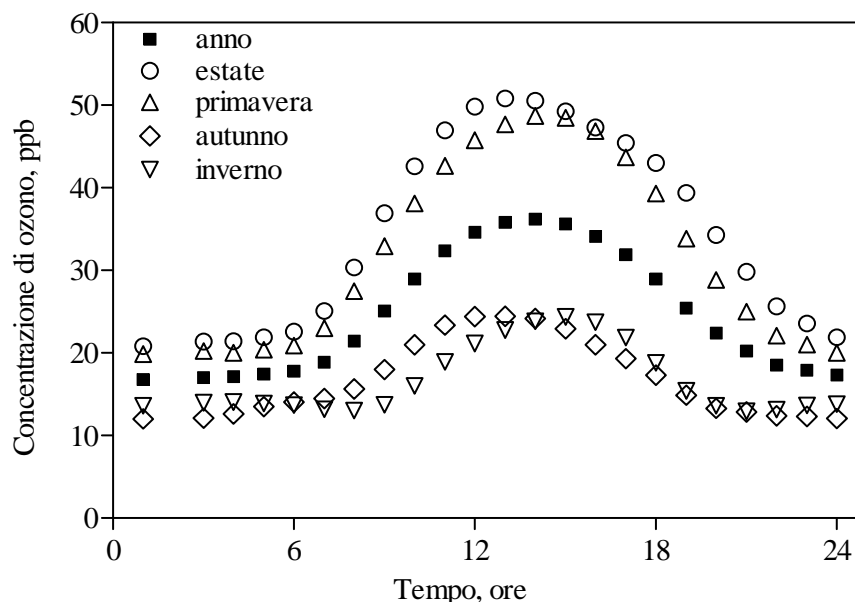


Figura 2 – Variazioni giornaliere e stagionali dell'ozono a San Piero a Grado, Pisa (da Nali e Lorenzini, 2009).

## 1.2. Ozono e vegetazione

Le piante sono i recettori più sensibili all'azione nociva dell'O<sub>3</sub> e non è casuale il fatto che la prima percezione di una problematica ambientale relativa alla presenza di ossidanti atmosferici sia legata appunto alla individuazione di anomalie nella vegetazione (Haagen-Smit *et al.*, 1952). Gli effetti macroscopici consistono inizialmente in una clorosi fogliare diffusa, di non semplice individuazione in quanto aspecifica; gli stadi successivi sono rappresentati da una “bronzatura” o dalla comparsa di necrosi puntiformi (*stippling*) o localizzate (*flecking*). In ogni caso, le zone interessate sono limitate al tessuto a palizzata delle regioni internervali. L'O<sub>3</sub> è caratterizzato da una spiccata “divergenza sintomatica”, così che il colore e la distribuzione delle lesioni variano anche ampiamente da specie a specie (Lorenzini e Nali, 2005) (Figura 3). Occorre, comunque, considerare che il sintomo più diffuso dovuto all'azione di questo inquinante è l'induzione prematura della senescenza, non sempre rilevabile in aria ambiente. Ormai da tempo si è andato affermando il concetto di danno “subliminale”, riferito agli effetti che non possono essere osservati macroscopicamente (Kley *et al.*, 1999; Bussotti *et al.*, 2003a). Essi coinvolgono aspetti biochimici e fisiologici

responsabili di riduzioni nella crescita e nei livelli quali-quantitativi della produzione, processi che nel loro insieme sono conosciuti come “sindrome da *stress* da O<sub>3</sub>” (Peñarrubia e Moreno, 1999). La Figura 4 sintetizza le molteplici interazioni tra piante ed O<sub>3</sub>, i cui ruoli ambientali sono altresì complessi, prendendo parte a diversi processi di ossidazione, contribuendo al fenomeno noto come “effetto serra” e riducendo la visibilità (Lorenzini e Nali, 2005).

E' certo che l'andamento generale è da tempo in continua e progressiva crescita (si stima dell'1-2% all'anno), in relazione all'aumentata presenza di precursori (Loranger *et al.*, 2004). Più precisamente, l'analisi delle tendenze sembra individuare leggere riduzioni dei valori di picco, ma significativi incrementi dei livelli medi e delle superfici nelle quali vengono superate le soglie di tossicità ambientale (Lefohn *et al.*, 2008). L'importanza dell'O<sub>3</sub> va discussa anche in prospettiva: se oggi il 10-35% delle produzioni cerealicole mondiali si realizzano in aree in cui i livelli di inquinamento sono tali da ridurre di almeno il 5-10% le rese (in termini meramente quantitativi), nel 2025 si ritiene che l'estensione di tali zone sarà almeno triplicata, se non verranno intraprese iniziative per abbattere le emissioni di precursori (Chameides *et al.*, 1994).

### **1.2.1. Fitotossicità dell'ozono**

L'O<sub>3</sub> reagisce con le piante nella loro fase solida (componenti cuticolari della foglia), gassosa (idrocarburi emessi dalla pianta) e liquida. Quest'ultimo caso riguarda la dissoluzione dell'inquinante nel mezzo acquoso, seguita dalla reazione con i lipidi, le proteine ed altre componenti cellulari (Rao *et al.*, 2000). Gran parte degli studi hanno focalizzato l'attenzione su questo punto, poiché la sua dissociazione negli spazi intercellulari del tessuto vegetale sembra avere i maggiori effetti negativi sulla pianta (Mudd, 1997).

L'O<sub>3</sub> è particolarmente tossico per gli organismi vegetali, per una serie di caratteristiche. Oltre al suo alto potenziale *redox*, ha approssimativamente lo stesso coefficiente di diffusione dell'anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) ed incontra, quindi, la stessa resistenza nella penetrazione fogliare e di membrana; inoltre, la sua solubilità in H<sub>2</sub>O (e, quindi, nel liquido cellulare) è dieci volte maggiore dell'O<sub>2</sub>; infine, reagisce con H<sub>2</sub>O maggiormente in ambiente alcalino (Colbeck e MacKenzie, 1994).

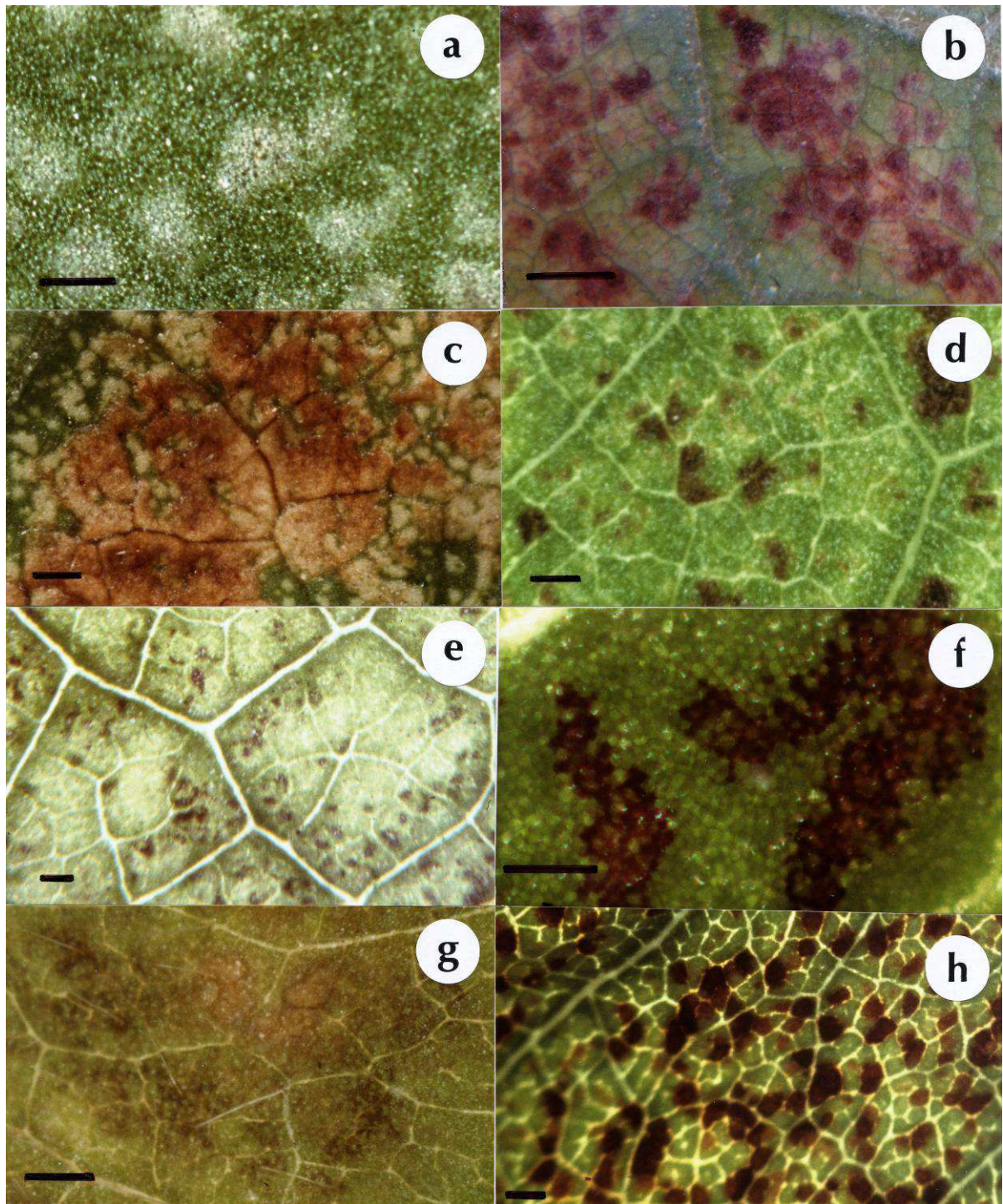


Figura 3 – Lesioni fogliari indotte dall'esposizione all'ozono osservate al microscopio stereoscopico: (a) tabacco (*Nicotiana tabacum* cv. Bel-W3); (b) vite (*Vitis vinifera* cv. Trebbiano); (c) ailanto (*Ailanthus altissima*); (d) pioppo (*Populus deltoides* x *maximowiczii* clone Eridano); (e) fagiolo (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto); (f): viburno (*Viburnum tynus*); (g) soia (*Glycine max* cv. Gemma); (h) robinia (*Robinia pseudo-acacia*). La barra equivale a 3 mm (da Lorenzini e Nali, 2005).



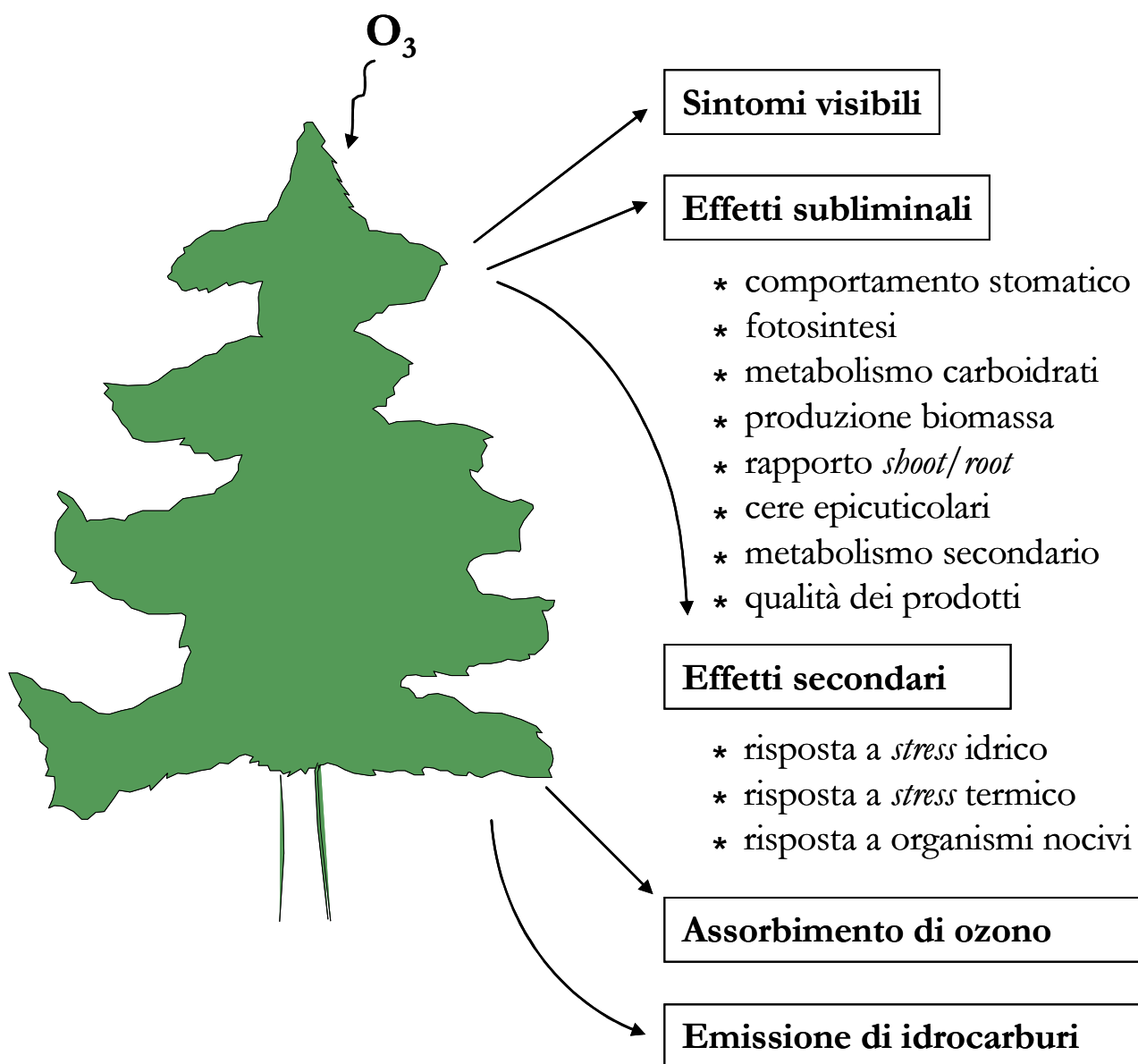
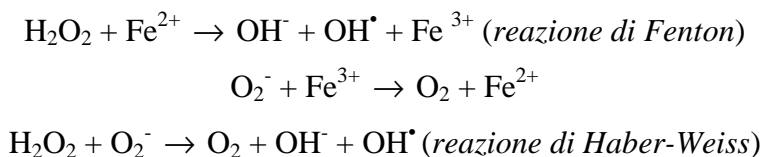


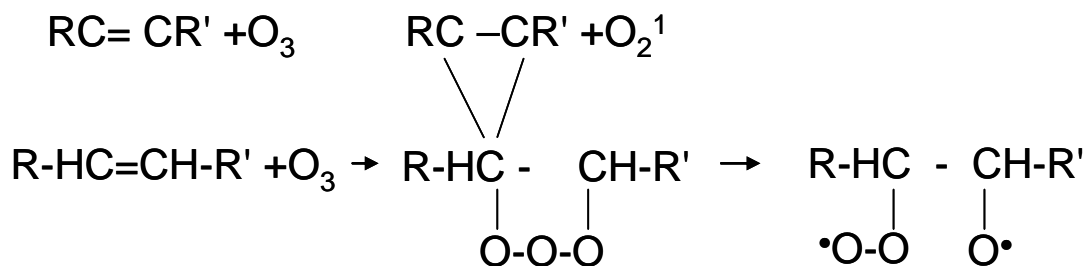
Figura 4 – Schematizzazione delle molteplici interazioni tra ozono e piante: esse costituiscono un bersaglio vulnerabile dell'azione tossica, con manifestazioni sintomatiche o invisibili ad occhio nudo, ma si possono innescare anche effetti secondari, in relazione alle menomate capacità di rispondere ad altri fattori ostili; inoltre, i vegetali contribuiscono alla rimozione dell'inquinante, per lo più a seguito di assorbimento fogliare; infine, le piante emettono idrocarburi volatili, che contribuiscono – al pari di quelli antropogenici – ai fenomeni che portano alla formazione dello *smog* fotochimico (da Lorenzini e Nali, 2005).



Sulla base degli studi condotti da Weiss (1935), l'O<sub>3</sub> si dissocia rapidamente in soluzione acquosa, generando specie reattive dell'O<sub>2</sub> (ROS, *Reactive Oxygen Species*), come l'anione superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e il perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ma anche - secondariamente alla reazione con altre biomolecole - ossigeno singoletto (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) e radicale ossidrilico (OH<sup>•</sup>). Quest'ultimo è il più attivo e potenzialmente dannoso per le strutture biologiche; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub><sup>-</sup> sono molto meno reattivi ed hanno la capacità di spostarsi per poche distanze molecolari (Halliwell e Gutteridge, 1989). Inoltre, il decadimento dell'O<sub>3</sub> nel mezzo acquoso si realizza con un tasso significativo soltanto ad elevati livelli di pH (circa 8) e, di conseguenza, la decomposizione diretta dell'inquinante è più lenta rispetto alle reazioni con le molecole biologiche (Kanofsky e Sima, 1995), che assumono, quindi, un ruolo principale nella produzione delle ROS. Sia O<sub>2</sub><sup>-</sup> che H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagiscono con i metalli di transizione nello stato ridotto (specialmente Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>+</sup>, rilasciati, ad esempio, dalle metallo-proteine dopo l'attacco ossidativo delle stesse ROS), generando il radicale idrossilico OH<sup>•</sup> attraverso le reazioni di Haber-Weiss e di Fenton:

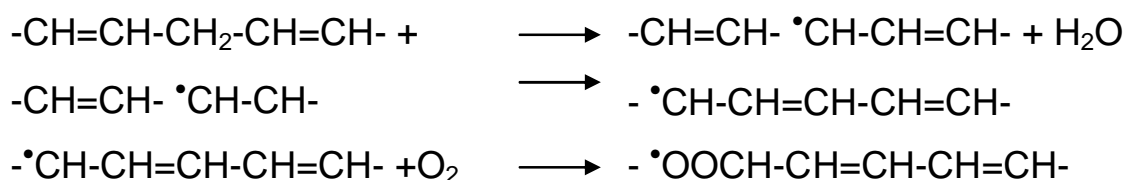


L'O<sub>3</sub> interagisce anche con molecole organiche contenenti doppi legami C-C, andando così ad incrementare la produzione di radicali liberi sia attraverso l'addizione del contaminante al doppio legame, con formazione dell'ozonide, sia tramite l'incorporazione di un atomo dell'inquinante in un prodotto ossidato, attraverso la formazione di epossido e <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Kanofsky e Sima, 1995):



Sulla base della misurazione del flusso di O<sub>3</sub> nella foglia, Laisk *et al.* (1989) hanno suggerito che l'inquinante non penetra profondamente negli spazi intercellulari, ma si

decomponere rapidamente a livello della parete cellulare e della membrana plasmatica. Poiché entrambe contengono numerose molecole organiche con doppi legami C-C (gruppi fenolici, composti olefinici, proteine ammidiche, ecc.), il primo sito cellulare di reazione dell'O<sub>3</sub> è proprio questo. L'inquinante può partecipare direttamente alla reazione di ozonolisi, attaccando le molecole lipidiche insature e generando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e aldeidi, in particolare malondialdeide (MDA) e 4-idrossinonenale (HNE) (Figura 5), ma anche alcani, epossidi, alcoli e altri prodotti di degradazione che possono facilmente interagire con DNA e proteine, con successiva formazione di pericolosi coniugati (Heath, 1987; Davies, 2001; Fam e Morrow, 2003). In alternativa può avvenire che l'OH<sup>•</sup>, o un'altra ROS, rimuova un atomo di idrogeno da un gruppo metile della catena, producendo - successivamente alla reazione con l'O<sub>2</sub> - un radicale perossile (Halliwell e Gutteridge, 1989) nel processo che prende il nome di perossidazione lipidica:



Il danno alla membrana plasmatica che ne deriva (i) modifica il trasporto degli ioni, (ii) fa aumentare la sua permeabilità e crollare il suo potenziale, (iii) inibisce l'attività delle pompe protoniche e favorisce l'ingresso degli ioni Ca<sup>2+</sup> dall'apoplasto.

L'O<sub>3</sub> ha anche la capacità di inattivare le proteine di membrana attraverso reazioni di ossidazione e tramite la modificazione dei gruppi funzionali degli aminoacidi, quali cisteina, metionina e triptofano; nel primo, i gruppi -SH di due molecole vanno a formare ponti S-S, con conversione a cistina; nel secondo, l'atomo di zolfo è ossidato a sulfossido; nel terzo, si ha la rottura dell'anello pirrolico. L'aggressione alle proteine coinvolge anche gli enzimi in seguito ad alterazioni della struttura secondaria e terziaria (Kelly e Mudway, 2003), nonché le ATPasi associate alla pompa ionica di membrana che possono essere inattivate, influenzando il trasporto fino al dissesto dell'osmoregolazione (Singh *et al.*, 2010).

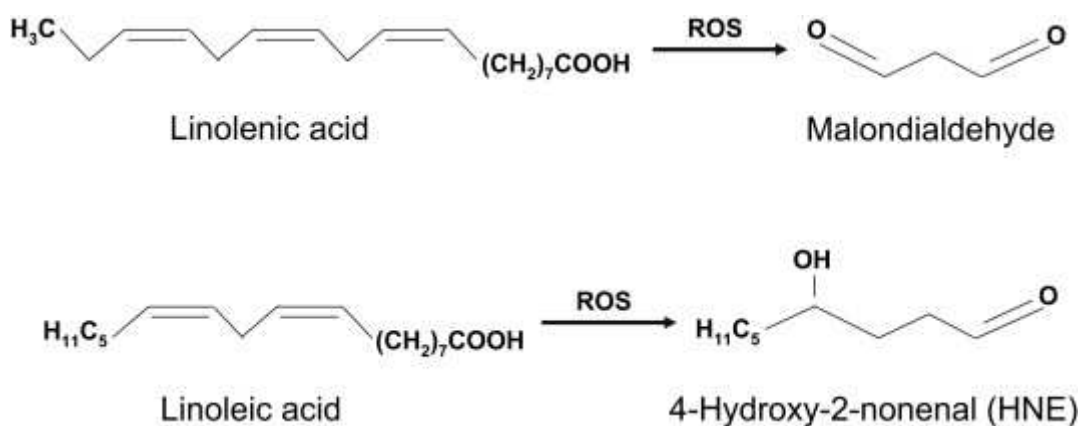


Figura 5 – L'attività delle ROS a carico dei lipidi di membrana porta a formazione di aldeidi (MDA, HNE) estremamente reattivi all'interno della cellula (da Gill e Tuteja, 2010).

Gli effetti fitotossici dell' $\text{O}_3$  si esprimono anche a livello fisiologico. Se attualmente è ormai comprovato che l'esposizione a tale composto determina una riduzione del tasso di fotosintesi netta (Heath, 1994; Pell *et al.*, 1997; Farage e Long, 1999; Morgan *et al.*, 2003), non è stato tuttavia ancora chiaramente identificato il sito cellulare bersaglio del danno da  $\text{O}_3$  (Guidi *et al.*, 2002). Gli stomi hanno sicuramente un ruolo fondamentale nel determinare il flusso di  $\text{O}_3$  che entra nel fluido apoplastico, dal momento che maggiore è la loro apertura e maggiore è la dose di inquinante che raggiunge gli spazi intercellulari (Sandermann e Matyssek, 2004; Gerosa *et al.*, 2009). Moldau *et al.* (1990) hanno dimostrato che l' $\text{O}_3$  induce una rapida chiusura stomatica già dopo 12 minuti di esposizione, quando ancora non si erano verificate alterazioni dell'efficienza di carbossilazione, sostenendo quindi che questa chiusura era la conseguenza di un effetto diretto dell'inquinante sulle cellule di guardia. Numerosi Autori hanno correlato la diminuzione dell'attività fotosintetica, osservata nelle piante esposte a  $\text{O}_3$ , ad una riduzione della conduttanza stomatica (Mansfield e Pearson, 1996; Kollist *et al.*, 2000; Tauszan *et al.*, 2007). Secondo altri Autori, invece, la riduzione della conduttanza stomatica sarebbe piuttosto il risultato di una diminuzione del livello di fotosintesi (Degl'Innocenti *et al.*, 2003; Flowers *et al.*, 2007). Martin *et al.* (2000), in effetti, attraverso modelli matematici costruiti con i dati di letteratura più recenti, hanno osservato che la risposta stomatica in seguito ad una esposizione acuta all' $\text{O}_3$  può essere prevista in base ai cambiamenti dell'attività fotosintetica delle cellule del mesofillo. Il coinvolgimento della fotosintesi nella risposta stomatica indotta dal contaminante è confermato anche da studi condotti da Joo *et al.* (2005), i quali hanno mostrato che il *burst* ossidativo, generato dall'inquinante, è indotto, in primo luogo, nei cloroplasti delle cellule di guardia. La

tolleranza all'O<sub>3</sub>, comunque, non dipende solo dall'attivazione del meccanismo di chiusura stomatica, ma anche dalla diversa capacità delle cellule fotosinteticamente attive del mesofillo di riparare i danni fotossidativi (Francini *et al.*, 2008).

La capacità di assimilazione è principalmente dovuta all'efficienza di carbossilazione, operata dalla ribulosio-1,5bisfosfato carbossilasi/ossigenasi (RuBisCO), enzima chiave nella fissazione della CO<sub>2</sub>, e l'O<sub>3</sub> indurrebbe una perdita della sua attività. Tale fenomeno sembra essere, però, imputabile alla diminuzione della concentrazione di questo enzima nelle foglie piuttosto che ad un decremento della sua attività (Farage e Long, 1999; Fiscus *et al.*, 2005). Anche Goumenakia *et al.* (2010) hanno osservato un significativo decremento del contenuto dell'enzima in foglie di lattuga esposte a O<sub>3</sub> per tre settimane consecutive (100 ppb, 8 h d<sup>-1</sup>). Esperimenti condotti da Glick *et al.* (1995) hanno dimostrato che il trattamento con O<sub>3</sub> in foglie di patata riduce il livello di trascritti di mRNA per la subunità minore della RuBisCO (*rbcS*), suggerendo quindi un'inibizione a livello di sintesi proteica. Questo risultato è in accordo con la riduzione del contenuto di RuBisCO osservato anche da Junqua *et al.* (2000) in piante di fagiolo (*Phaseolus vulgaris*) trattate con O<sub>3</sub>. Il decremento nella quantità di RuBisCO potrebbe essere indotto da diversi meccanismi, come (i) l'aumento della degradazione delle proteine legate alla sua produzione, (ii) l'inibizione della loro sintesi (Pell *et al.*, 1994; Brendley *et al.*, 1998; Junqua *et al.*, 2000) o (iii) la diretta frammentazione della proteina dovuta a fenomeni ossidativi operati dalle ROS (Ishida *et al.*, 1999). Questi processi potrebbero verificarsi contemporaneamente o meno, in dipendenza della concentrazione dell'O<sub>3</sub>, del tempo di esposizione e dell'età delle foglie (Junqua *et al.*, 2000). La degradazione delle proteine potrebbe essere dovuta all'aumentata attività di enzimi proteolitici o a modificazioni della RuBisCO operate da radicali liberi. Secondo alcuni Autori (Pell *et al.*, 1994), la perdita dell'enzima in questione, per ossidazione o degradazione nei cloroplasti in condizioni di *stress* ossidativo, è mascherata da un'alta capacità di *turnover* di questa proteina a livello fogliare, meccanismo che implica un pesante costo energetico per le piante. Altri Autori affermano, invece, che la rapida rigenerazione non viene mantenuta e quindi di conseguenza si ha una progressiva diminuzione del contenuto di RuBisCO (Gaucher *et al.*, 2003). Diversi esperimenti hanno, inoltre, dimostrato che la riduzione della quantità e dell'attività dell'enzima, in seguito a esposizioni croniche, caratterizza principalmente le foglie mature, sulle quali si realizza anche la progressiva comparsa di sintomi (Pell *et al.*, 1992; Brendley *et al.*, 1998; Lütz *et al.*, 2000), mentre in quelle più giovani l'attività risulta

essere stimolata rispetto ai controlli mantenuti in aria filtrata (Landolt, 1997; Gaucher *et al.*, 2003).

Molti *stress*, in particolare l'O<sub>3</sub>, possono limitare la capacità della pianta di utilizzare l'energia luminosa. In assenza di un adeguato meccanismo capace di prevenire il danno dovuto all'accumulo dell'energia di eccitazione nell'apparato fotochimico, una diminuzione del tasso fotosintetico può culminare in una ulteriore riduzione dei centri di reazione fotosistemici e causare (anche in corrispondenza di una moderata densità di flusso dei fotoni) un meccanismo di fotoinibizione (Flower *et al.*, 2007). Questo processo luce-dipendente, consiste essenzialmente in due eventi: la diminuzione del trasferimento dell'energia di eccitazione ai centri di reazione del fotosistema II (PSII) e l'inattivazione e conseguente degradazione della proteina D1 dei medesimi. In seguito a ciò, si innesca un processo di degradazione a carico delle altre componenti proteiche dello stesso centro di reazione, con conseguente completa distruzione di tale fotosistema (Ciompi *et al.*, 1997; Ranieri *et al.*, 2000). È possibile ricavare indicazioni utili sul funzionamento del PSII e, quindi, sull'attività fotosintetica delle piante, anche mediante l'analisi della fluorescenza della clorofilla *a*. Questa tecnica appare, infatti, particolarmente utile e sensibile per testare la risposta degli organismi vegetali ai diversi tipi di *stress* ambientali (Faraloni *et al.*, 2011). L'efficienza fotochimica ottimale del PSII è determinata mediante la misurazione (*in vivo*) del parametro  $F_v/F_m$  o in alternativa di  $F_v/F_0$ . Il primo è determinato dal rapporto fra la fluorescenza variabile ( $F_v$ ) e la fluorescenza massima ( $F_m$ ), il secondo fra la  $F_v$  e la fluorescenza minima ( $F_0$ ). Entrambi sono testati su campioni adattati al buio (Bolhàr-Nordenkamp *et al.*, 1989; Pereira *et al.*, 2000) e sono considerati buoni indicatori del danno da fotoinibizione, anche se il secondo sembra riuscire a dare migliori informazioni su piccole variazioni a carico dell'attività del PSII (Pereira *et al.*, 2000).

Nel contrastare la sequenza di eventi dannosi che portano alla distruzione del fotosistema, è di cruciale importanza il meccanismo di dissipazione dell'eccesso di energia luminosa operato dalle xantofille (Demmig-Adams e Adams, 1996a; Yamamoto e Bassi, 1996; Ranieri *et al.*, 2000; Ranieri *et al.*, 2001a; Castagna e Ranieri, 2011). Queste rappresentano uno dei principali gruppi di carotenoidi, composti isoprenoidi a 40 atomi di carbonio, caratterizzati da numerosi doppi legami coniugati, normalmente presenti come pigmenti accessori nei complessi antenna dei due fotosistemi, dove consentono di ampliare lo spettro di assorbimento degli organismi fotosintetici. Questi composti svolgono un'importante funzione protettiva a prevenzione del danno fotossidativo, neutralizzando lo stato eccitato di

tripletto della clorofilla e  $^1\text{O}_2$ . Tra le xantofille, rivestono particolare importanza violaxantina, anteraxantina e zeaxantina, coinvolte in un processo di dissipazione termica dell'energia in eccesso (Jahnsa e Holzwarthb, 2012), noto come ciclo delle xantofille. Tale ciclo prevede la conversione della violaxantina a zeaxantina, attraverso l'intermedio anteraxantina, tramite reazioni di depossidazione ed il cammino inverso per via epossidativa (Figura 6).

Nel PSII la formazione di zeaxantina e anteraxantina attraverso le reazioni di depossidazione del ciclo delle xantofille è essenziale per la dissipazione termica pH dipendente dell'energia luminosa assorbita (Havaux *et al.*, 2000).

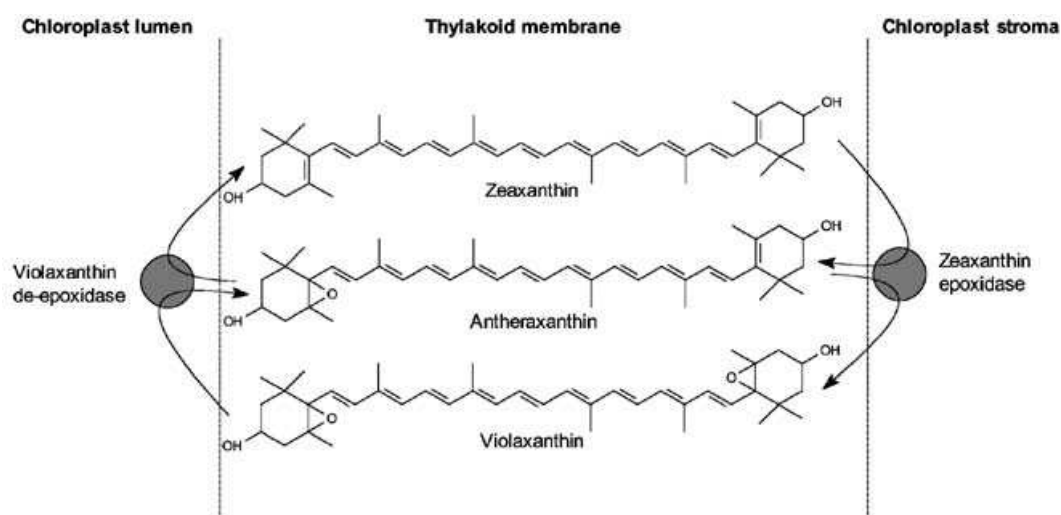


Figura 6 – Rappresentazione schematica del ciclo delle xantofille nella membrana tilacoidale del cloroplasto (da D'Haese *et al.*, 2004).

La comparsa di anteraxantina e zeaxantina assieme ai cambiamenti conformazionali delle proteine che legano la clorofilla del complesso antenna complesso antenna (*light-harvesting complex II*, LHCII), anch'essi indotti dall'acidificazione del *lumen*, determinano l'aggregazione di questi complessi e permettono la dissipazione dell'energia luminosa sotto forma di calore (Figura 7). In questo contesto sarebbe una proteina di 22 kDa, chiamata CP22, associata al PSII, a giocare un ruolo chiave nel processo di dissipazione termica dell'energia in eccesso (Niyogi *et al.*, 2005). Questi meccanismi fotoprotettivi sono frequentemente misurati come non fotochimico (NPQ), ossia come la componente pH-dipendente del *quenching* della fluorescenza della clorofilla *a* che non è correlata alla fotochimica (Kaňa e Vass, 2008). Recentemente D'Haese *et al.* (2004) hanno proposto un modello matematico che descrive la cinetica di rilassamento dell'NPQ durante il trasferimento alla luce di un campione adattato al buio. Esso comprende due funzioni: una  $fp(x)$  (*Peak function*), che rappresenta il

picco iniziale di NPQ, e una  $fs(x)$  (*Sigmoid function*), che indica la saturazione sigmoidale di NPQ alla fine della misurazione. Questi Autori hanno trovato che le stesse curve rappresentano, rispettivamente, la cinetica della conversione enzimatica della violaxantina in anteraxantina e dell'anteraxantina in zeaxantina, confermando, quindi, il loro ruolo nell'induzione di NPQ.

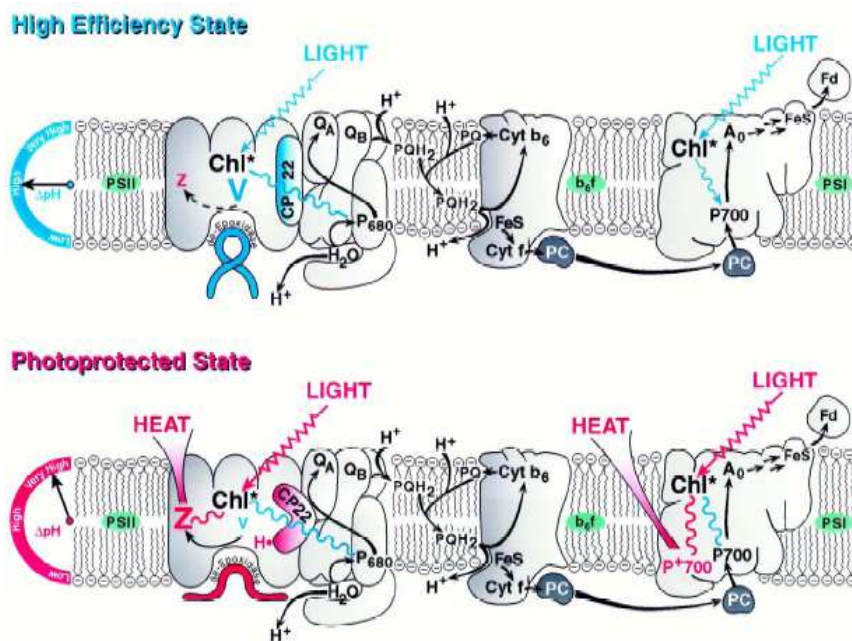


Figura 7 – Rappresentazione schematica della conversione, a livello della membrana tilacoide, da stato di alta efficienza ad una condizione di fotoprotezione. I principali elementi coinvolti in questa conversione sono evidenziati dal passaggio dal blu al rosa.

### 1.2.2. La risposta delle piante all'ozono

La tossicità dipende essenzialmente da tre fattori: (i) la penetrazione all'interno dei tessuti fogliari, (ii) l'influenza dell'inquinante sui costituenti cellulari e, infine, (iii) le eventuali reazioni di difesa. Riguardo al primo punto, è da tempo nota una notevole variabilità inter- e intraspecifica; ad esempio, alcune *cultivar* di tabacco simili per caratteri morfologici e produttivi rispondono in maniera quanto mai differente all'O<sub>3</sub>. Una schematica rappresentazione dei meccanismi alla base di questi comportamenti differenziali, riferita alla nota "teoria generale della risposta agli *stress*" è riportata in Figura 8. La prima possibile strategia (esclusione) prevede la chiusura degli stomi con la conseguente diminuzione nell'assorbimento dei gas (compresa la CO<sub>2</sub>); questa via risulta percorribile nel caso di esposizioni acute, quindi, limitate ad un periodo di tempo tale da non compromettere il

processo fotosintetico (Wieser e Matyssek, 2007). Il secondo meccanismo di difesa consiste nell'attivazione di sistemi di detossificazione per le ROS (Castagna e Ranieri, 2009), così da confinare il danno ossidativo. Gli organismi vegetali producono  $O_2$  e  $H_2O_2$  non solo come conseguenza della fitotossicità dell' $O_3$ , ma anche come risultato del loro normale metabolismo aerobico, ovvero in processi quali il trasporto di elettroni nei cloroplasti durante la fotosintesi e nei mitocondri con la respirazione (Foyer e Noctor, 2003). In condizioni non perturbate, nei tessuti cellulari è mantenuto uno stato di equilibrio tra formazione e rimozione delle ROS, attraverso l'azione di sistemi antiossidanti di natura enzimatica [ad esempio, superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT) e perossidasi (POD)] e non (quali acido ascorbico, glutatione, carotenoidi, flavonoidi e composti fenolici) (Podila *et al.*, 2001). Se essi non vengono attivati (o falliscono nell'arrestare le reazioni a catena di auto-ossidazione), il risultato finale è la morte cellulare. In molte specie la tolleranza al danno ossidativo è ereditata come una forma quantitativa e la estesa gamma delle risposte in presenza dell'inquinante non è altro che l'espressione di eventi molecolari coinvolgenti percorsi metabolici diversi e dipende dall'attivazione di geni con precise funzioni nella difesa (Conklin e Barth, 2004).

L'acido ascorbico (AsA; Vit. C), l' $\alpha$ -tocoferolo (Vit. E), il  $\beta$ -carotene (precursore della Vit. A) e il glutatione (un tripeptide composto da glicina, acido glutammico e cisteina) sono tra i metaboliti con elevato potere riducente, implicati nella detossificazione delle ROS (Kangasjärvi *et al.*, 1994; Sandermann, 1996; Xua *et al.*, 2006). Anche le poliammine sembrano coinvolte nei fenomeni di difesa dallo *stress* ossidativo: trattamenti esogeni con questi composti azotati prima delle fumigazioni con  $O_3$ , su pomodoro e tabacco, hanno portato ad una significativa riduzione nella comparsa dei sintomi (Ormrod e Beckerson, 1986; Bors *et al.*, 1989). Inoltre, poichè i metalli di transizione promuovono la produzione delle ROS attraverso le reazioni di Haber-Weiss e Fenton, i metallo-chelatori, come fitochelatine e metallotoneine, hanno proprietà difensive (Peñarrubia e Moreno, 1999).

Nelle cellule vegetali, il più importante substrato per la detossificazione, in seguito a varie situazioni di *stress*, è l'AsA (Shana e Lianga, 2010) e l'ascobato perossidasi (APX) ne utilizza due molecole per ridurre l' $H_2O_2$  ad  $H_2O$ , attraverso una serie di reazioni conosciute come ciclo dell'ascobato-glutatione o ciclo di Halliwell-Asada (Figura 9) (Noctor e Foyer, 1998). Questi composti sono coinvolti anche in una serie di altre reazioni rigeneranti antiossidanti all'interno della cellula.





Figura 8 – Rappresentazione schematica, riferita all’ozono, delle componenti della resistenza di un organismo a un fattore di *stress*, in accordo con la teoria di Levitt (da Lorenzini e Nali, 2005).

Ad esempio, l’AsA agisce come riduttore nella rigenerazione dell’ $\alpha$ -tocoferolo (detossificante i radicali provenienti dalla perossidazione lipidica), nel ciclo delle xantofille e nella detossificazione dell’ $\text{H}_2\text{O}_2$  mediata dall’APX sulla superficie tilacoidale del cloroplasto (Mieda *et al.*, 2004). Inoltre, studi recenti condotti con il mutante di *Arabidopsis thaliana*  $\text{O}_3$ -sensibile *vtc1* hanno dimostrato che l’AsA rappresenta anche una molecola chiave nella complessa rete di segnale che porta all’attivazione delle reazioni di difesa nelle piante e alla senescenza fogliare (Conklin e Barth, 2004). Nonostante i numerosi studi presenti in bibliografia, una relazione funzionale diretta tra singoli composti antiossidanti – come l’AsA – e la sensibilità all’ $\text{O}_3$  rimane comunque non del tutto chiara. Studi condotti da D’Haese *et al.* (2005) hanno evidenziato, ad esempio, come l’AsA apoplastico da solo non possa essere il responsabile della differente tolleranza all’ $\text{O}_3$  dei cloni NC-S (sensibile) e NC-R (resistente) della cv. Regal di *Trifolium repens*.

Risultati contraddittori riguardo agli effetti dell’ $\text{O}_3$  sull’attività ed i livelli di espressione degli enzimi antiossidanti sono spesso stati ottenuti, probabilmente, per le differenze nei sistemi vegetali utilizzati e nei trattamenti effettuati nelle diverse indagini.

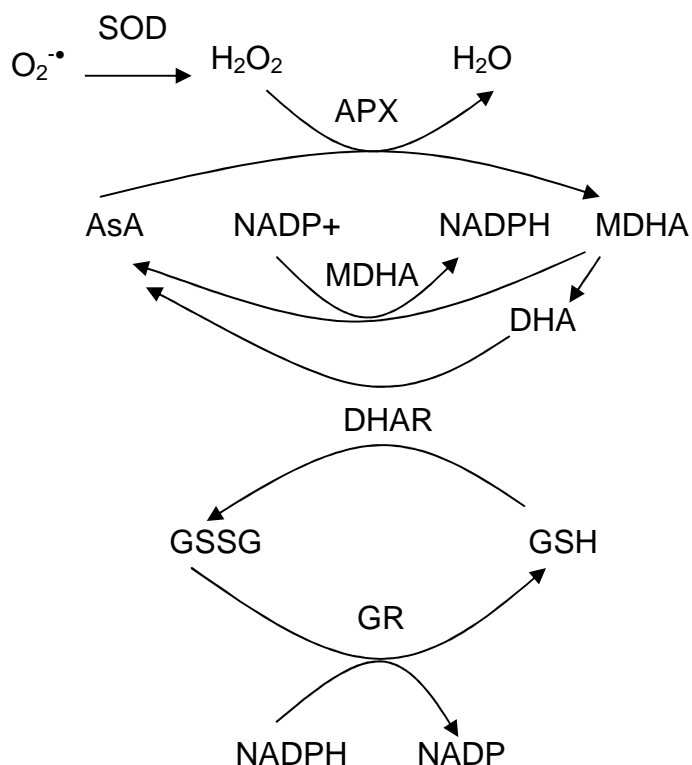


Figura 9 – Il ciclo ascorbato-glutatione o di Halliwell-Asada. Gli enzimi partecipanti alla via metabolica sono superossido dismutasi (SOD), ascorbato perossidasi (APX), deidroascorbato reduttasi (DHAR), monodeidroascorbato reduttasi (MDHA) e glutazione reduttasi (GR). Le altre abbreviazioni si riferiscono a ascorbato (ASA), monodeidroascorbato (MDHA), deidroascorbato (DHA), glutazione ridotto (GSH) e glutazione ossidato (GSSG).

Complesso è, poi, il ruolo della fenilalanina ammonio-liasi (PAL), il primo enzima della via biosintetica dei fenilpropanoidi, uno dei più importanti *pathway* nel metabolismo secondario, che conduce alla sintesi di composti fenolici con funzione strutturale e di difesa. Essa catalizza la formazione dell'acido *trans*-cinnamico, attraverso la deaminazione della L-fenilalanina (Schuster e Retey, 1995; Chen *et al.*, 2006). In questo modo, essa regola il flusso dell'aminoacido fenilalanina verso la biosintesi dei composti fenolici e rappresenta, quindi, l'enzima chiave tra il metabolismo primario e il secondario (Boudet, 2007). Per questi composti, come lignine, acidi fenolici, stilbeni, antociani e flavonoidi, è stata da tempo dimostrata la loro importante funzione antiossidante come *scavenger* di ROS e di protezione della pianta dal danno fotossidativo (Close e McArthur, 2002). L'attività della PAL è indotta in numerose situazioni di *stress*, di natura sia biotica, come l'attacco di patogeni, che abiotica, ovvero da inquinanti ambientali, come l' $O_3$ , ma anche da alte temperature, ferite o esposizione ai raggi UV-B (Wen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006). In Figura 10 è riportata una

rappresentazione schematica dei diversi tipi di *stress* che inducono produzione e accumulo di metaboliti secondari.

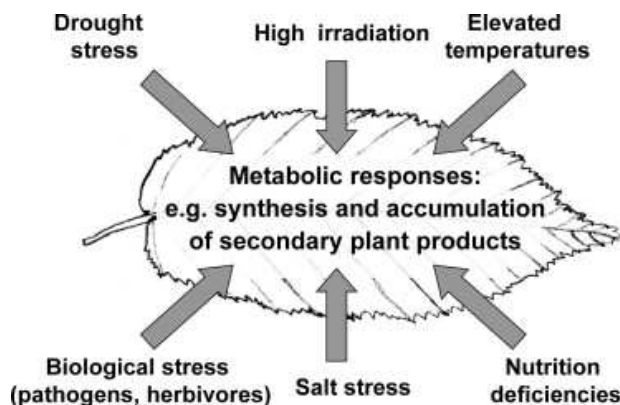


Figura 10 – Azione dei diversi tipi di *stress* responsabili della produzione e accumulo dei prodotti del metabolismo secondario (da Selmar e Kleinwächter, 2012).

Trattamenti con O<sub>3</sub> hanno dimostrato di incrementare sia l'attività dell'enzima che la sua espressione genica in prezzemolo (Eckey-Kaltenbach *et al.*, 1994b), pomodoro (Guidi *et al.*, 2005), betulla (Pääkkönen *et al.*, 1998), *Centaurea jacea* (Francini *et al.*, 2008), tabacco, fagiolo e pioppo (Biagioni *et al.*, 1997; Paolacci *et al.*, 2001). Anche singoli episodi di O<sub>3</sub> a dosi subacute sono in grado di indurre i geni, gli enzimi e i prodotti di biosintesi del metabolismo secondario (Francini *et al.*, 2007).

Purtroppo, il ruolo del sistema antiossidante nel detossificare le ROS rimane ancora parzialmente sconosciuto e non ci sono evidenze conclusive sul conferimento di tolleranza alle piante. Rimane, inoltre, aperta la questione relativa al possibile ruolo del *pool* nell'apoplasto, trattandosi del primo sito dove l'O<sub>3</sub> ed i suoi derivati tossici possono essere aggrediti (Tuzet *et al.*, 2011).

Nelle relazioni pianta-ambiente assumono particolare importanza i composti fenolici, una delle principali classi di metaboliti secondari, che comprendono un ampio *range* di sostanze caratterizzate dalla presenza di un anello aromatico legato a uno o più sostituenti ossidrilici (Troszyńska e Ciska, 2002). Nelle specie vegetali, la classe più ampiamente diffusa è quella dei fenilpropanoidi, caratterizzati dallo scheletro carbonioso di base C6-C3 della fenilalanina e derivanti tutti dall'acido cinnamico prodotto per azione della PAL. La via biosintetica, che porta alla sintesi di questi metaboliti, prevede una serie di reazioni di idrossilazione, metilazione e deidratazione a carico dell'acido cinnamico, attraverso le quali si

formano i comuni acidi idrossicinnammici, quali *p*-cumarico, caffeico, ferulico, sinapico, e le cumarine.

### ***1.2.3. Ozono come strumento per studiare la morte cellulare programmata***

La penetrazione dell'O<sub>3</sub> nella pianta e la successiva generazione delle ROS hanno due effetti contrapposti: da una parte, sono responsabili dello *stress* ossidativo e, dall'altra, agiscono come segnale di inizio della morte cellulare programmata (*Programmed Cell Death*, PCD) e da elicitori abiotici dei meccanismi di difesa conosciuti come reazione di ipersensibilità (*Hypersensitive Response*, HR) e resistenza sistemica acquisita (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) (Sandermann *et al.*, 1998).

A seguito del danneggiamento dei cloroplasti, si verifica il collasso delle cellule del mesofillo, secondo un tipico meccanismo di risposta ipersensibile generato dall'accumulo di ROS (Wohlgemuth *et al.*, 2002) e specialmente di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel citoplasma (Oksanen *et al.*, 2003). Le lesioni HR-simili, indotte rapidamente dal sistema difensivo, e spesso precedenti la SAR (Sandermann *et al.*, 1998; Rao *et al.*, 2000), sono tipicamente riscontrate in piante resistenti durante la reazione di incompatibilità (McDowell e Dangl, 2000). E' dimostrato che queste attivano il *burst* ossidativo non solo in risposta all'azione del contaminante, ma anche come generico meccanismo difensivo rispetto ad altri fattori, sia biotici (Kangasjärvi *et al.*, 2005) che abiotici (Iriti e Faoro, 2008). Gli effetti dell'O<sub>3</sub>, infatti, si esplicano attraverso una cascata di eventi regolati dall'induzione di molecole-segnaie, quali acido jasmonico (JA), acido salicilico (SA) ed etilene (ET) (Iriti e Faoro, 2008), che medierebbero la stimolazione di risposte secondarie a livello genico, metabolico ed ormonale, analoghe a quelle attivate a seguito dell'attacco di un patogeno (Overmeyer *et al.*, 2003). In Figura 11 è riportato un fenomeno *HR-like*, che le ROS prodotte dall'inquinante possono stimolare, in modo che non venga superata la soglia di citotossicità. Tale modalità di risposta include la produzione di metaboliti secondari e l'attivazione di geni comunemente indotti durante l'interazione pianta-patogeno, come ad esempio le fitoalessine (Sharma e Davis, 1997), e codificanti per molecole della barriera cellulare, quali lignina e callosio, oppure per proteine legate alla patogenesi (PR), come glucanasi, chitinasi e glutatione S-transferasi (Langebartels *et al.*, 2002).

La risposta comune delle piante all'O<sub>3</sub> e ai patogeni ha portato alla conclusione che questo inquinante, o le ROS ad esso associate, come anche l'elicitore biotico, inducono una stessa via biosintetica di segnalazione (Langebartels *et al.*, 2001). Questa similarità è legata principalmente alla comune comparsa di O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in risposta all'attacco, che suggerisce un

ruolo come segnalatori locali e sistemici nell'azione di difesa cellulare (Overmeyer *et al.*, 2000). L'accumulo di queste ROS, verificato in numerose specie (Schraudner *et al.*, 1998; Pellinen *et al.*, 1999; Rao e Davis, 1999), avviene in corrispondenza dello spazio extracellulare del tessuto a palizzata, sito principale di attacco dell'O<sub>3</sub> (Guderian, 1985).

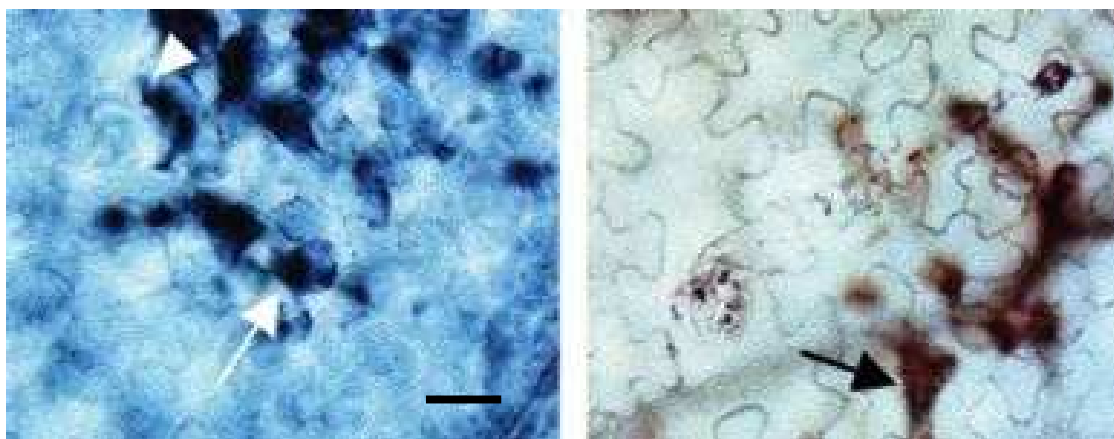


Figura 11 – Tessuto fogliare di piante di *Nicotiana tabacum* cv. Bel-W3 esposte a ozono (50 ppb, 3 h): a sinistra, cellule morte del tessuto a palizzata (freccia) e spugnoso (punta di freccia), colorate con Evans blu 24 ore dopo il trattamento: esse rappresentano il primo stadio di sviluppo della lesione necrotica; a destra, depositi di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> colorati con DAB (3,3' diaminobenzidina) (freccia) in cellule del tessuto a palizzata 24 ore dopo il trattamento (modificata da Iriti *et al.*, 2006).

L'evidenza di questa massiccia e rapida attivazione del metabolismo ossidativo immediatamente dopo l'esposizione allo *stress* da O<sub>3</sub> completa il quadro secondo il quale tutte le strategie di difesa della pianta dai patogeni sono attivate in presenza di questo inquinante (Langebartels *et al.*, 2002). La sua abilità nel “mimare” simultaneamente tutte le risposte indotte dagli *stress* biotici è di grande aiuto per lo studio delle interazioni tra le vie di segnalazione che influenzano la PCD (Rao *et al.*, 2000).

### **1.2.4. Interazioni tra le vie di segnalazione che influenzano la morte cellulare programmata**

La capacità della pianta di adattarsi all'ambiente dipende dalla velocità e dall'efficienza con le quali essa riesce a riconoscere uno *stress*, generare molecole-segnale e dare inizio ad una risposta che induca il suo metabolismo a compensare i cambiamenti esterni (Rao *et al.*, 2000). Dopo il riconoscimento del fattore di *stress* biotico o abiotico, vengono attivate numerose segnalazioni a catena, al fine di innescare le vie di difesa. Le ROS da sole non sono sufficienti ad indurre la PCD, ma devono agire insieme ad altre componenti segnale (Langebartels *et al.*,

2002; Rao *et al.*, 2002). Kangasjärvi *et al.*, (2005) hanno ipotizzato la sequenza di eventi che si verifica nelle piante esposte a O<sub>3</sub>, così come riportato in Figura 12. L'agente ossidante, penetrando tramite le aperture stomatiche, è degradato a ROS nell'apoplasto (*step 1* in Figura 12); il loro accumulo è influenzato dall'azione di antiossidanti, quali ASA. Le ROS attivano una catena di trasduzione del segnale, che dipende dalle proteine G (2). La prima fase coinvolge il complesso  $\beta\gamma$  e induce la formazione di ROS nel cloroplasto (3). L'ulteriore trasmissione del segnale delle ROS cloroplastiche richiede l'azione della subunità  $\alpha$  della proteina G e risulta nell'attivazione delle NADPH ossidasi di membrana (4), che produrranno nuove ROS, ritenute responsabili della trasmissione del segnale alle cellule adiacenti (Joo *et al.*, 2005). In questo modo, inizia anche la diffusione della morte cellulare mediata da SA (5). Parallelamente e indipendentemente dalle proteine G, viene attivata la cascata delle MAP chinasi (6). L'attivazione di AtMPK6 in *Arabidopsis thaliana* (SIPK in tabacco) determina la fosforilazione dell'acido 1-amminociclopropan-1-carbossilico sintasi (ACS) che porta ad un aumento della biosintesi di ET (7). L'alterazione del flusso di Ca<sup>2+</sup> avviene nei primi stadi di trasduzione del segnale ed è responsabile dell'attivazione delle MAP chinasi e delle NADPH ossidasi (8). La diffusione del segnale fra le cellule, ma anche la capacità delle cellule di percepire e rispondere al segnale delle ROS sembra essere mediata da ET (7 e 9). Questo processo si ripete in quello che è noto come “*ciclo ossidativo di morte cellulare*”, che coinvolge, assieme a ET, SA e JA (10) e porta alla formazione delle lesioni. Questo meccanismo regola un *set* di risposte indotte dall'O<sub>3</sub>, che includono la morte cellulare e la trascrizione di geni correlati alla difesa (11).

In generale, ET e SA amplificano il segnale ossidativo e determinano la diffusione delle lesioni, mentre JA ha la funzione di contenere e limitare il danno indotto dall'O<sub>3</sub>. Il *burst* ossidativo differisce negli individui sensibili e in quelli resistenti all'inquinante. In entrambi si ha una elevata produzione iniziale di ROS in risposta all'O<sub>3</sub>, ma solo nei sensibili si verifica un secondo *burst* mediato dall'ET e dalle proteine G, che porta alla diffusione della morte cellulare e ad un incremento della concentrazione dei prodotti di perossidazione lipidica delle membrane. Questi ultimi, a loro volta, costituiscono il substrato per la biosintesi di JA, il quale, determinando una riduzione della sensibilità a ET delle cellule adiacenti alla lesione, porta ad una graduale riduzione della produzione di ROS e, quindi, al contenimento della morte cellulare (Wang *et al.*, 2002).

La natura del risultato finale delle reazioni di difesa è la diretta conseguenza dall'ampiezza dell'intercomunicazione che esiste tra le varie molecole-segnaletto (Dong, 1998).

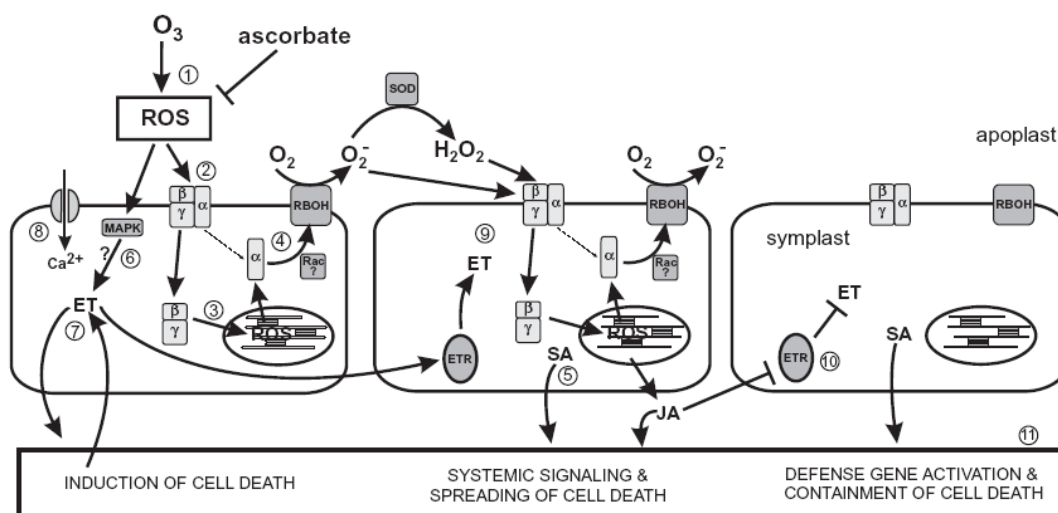


Figura 12 – Trasduzione e progressione spaziale del segnale indotto dall’esposizione all’ozono (da Kangasjärvi *et al.* 2005). Per gli step, cfr. il testo.

ET, oltre ad avere un ruolo principale nella propagazione delle ROS e nello sviluppo di necrosi, è una delle risposte biochimiche all’O<sub>3</sub> più precoce in tutte le specie studiate (Figura 13) (Kangasjärvi *et al.*, 2005). Messa a confronto con le cinetiche di sintesi di altre due molecole-segnale, SA e JA, ET le precede entrambe. La sua produzione è strettamente correlata alla sensibilità della pianta all’inquinante e i suoi livelli sono decisamente più elevati nei genotipi sensibili a O<sub>3</sub> (Tingey *et al.*, 1976; Wellburn e Wellburn, 1996; Overmeyer *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2000, 2002; Moeder *et al.*, 2002; Kanna *et al.*, 2003; Tuominen *et al.*, 2004). Mutanti di *A. thaliana* (*eto1*, *eto2*, *eto3*), che iperproducono questo ormone, mostrano una maggiore sensibilità al contaminante rispetto al *wild type*. Al contrario, mutanti non sensibili a ET (*ein2*, *ein3*) risultano anche resistenti a O<sub>3</sub> (Kangasjärvi *et al.*, 2005).

La biosintesi di ET, indotta da O<sub>3</sub>, è regolata a livello dell’enzima ACC-sintasi (ACS), che converte la S-adenosil-metionina (S-AdoMet) in acido 1-aminociclopropano-1carbossilico (ACC), essendo quest’ultimo il diretto precursore di ET (Kangasjärvi *et al.* 2005). La produzione di ET, in seguito all’esposizione ad O<sub>3</sub>, sarebbe il risultato dell’induzione di specifici membri della famiglia dei geni ACS. In *A. thaliana*, ad esempio, è il gene At-ACS6 ad essere rapidamente indotto da O<sub>3</sub> (Vahala *et al.*, 1998; Overmeyer *et al.*, 2000; Tamaoki *et al.*, 2003).

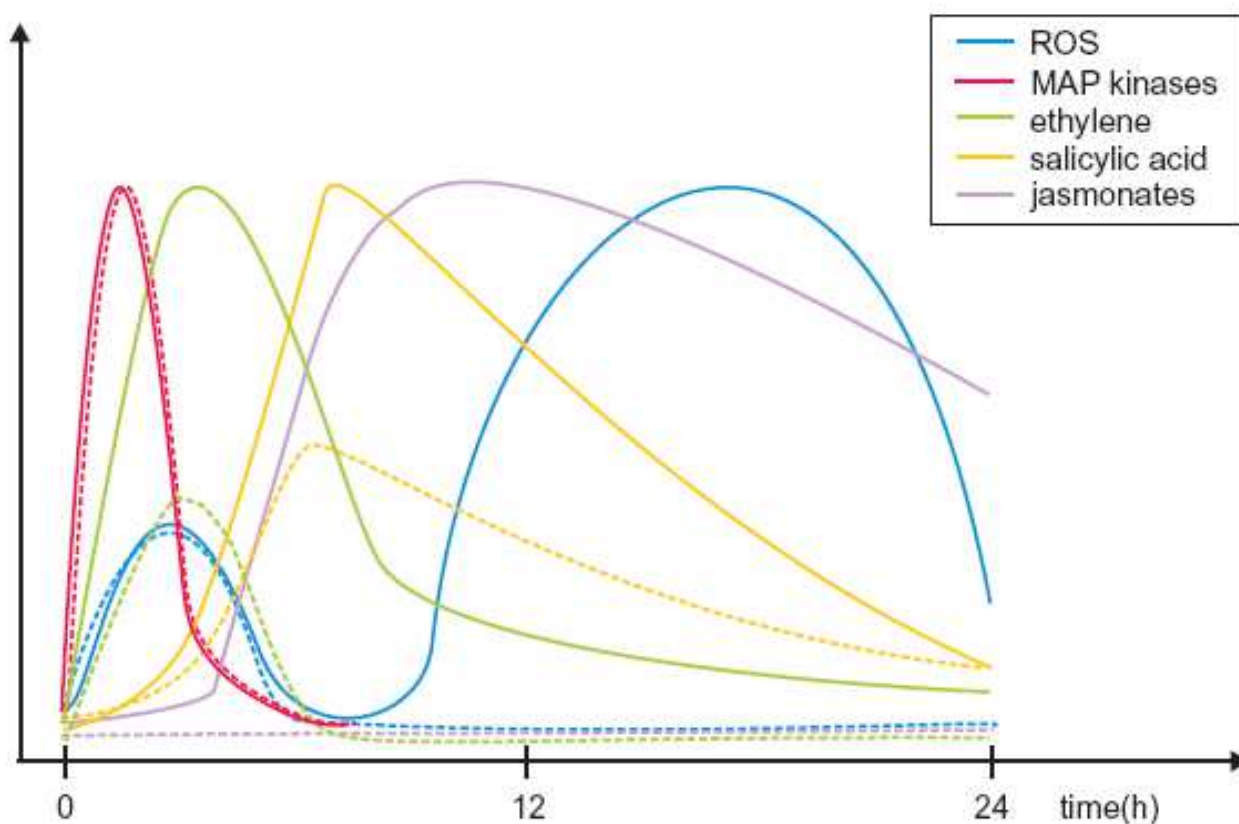


Figura 13 – Evoluzione temporale nell’attivazione e nell’accumulo di molecole-segnale indotte da ozono in esposizioni di 4-6 ore a concentrazioni tali da indurre sintomi nei genotipi sensibili. Le linee continue si riferiscono al materiale sensibile e quelle tratteggiate al resistente (da Kangasjärvi *et al.*, 2005).

Analogamente, in pomodoro è stata osservata una induzione sequenziale di geni ACS, che si realizza in due fasi: nella prima, viene rapidamente indotta l’espressione dei geni Le-ACS1B e Le-ACS6; poi, si ha una riduzione dei livelli dei loro mRNA ed una simultanea induzione del gene Le-ACS2 (Nakajima *et al.*, 2001; Moeder *et al.*, 2002).

### 1.3. Piante medicinali e alterazione della qualità in risposta a condizioni di *stress*

Con il termine “pianta medicinale”, secondo l’Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), viene indicato “ogni vegetale che contiene, in uno o più dei suoi organi, sostanze (*i*) che sono precursori di emisintesi chemiofarmaceutiche, oppure (*ii*) che possono essere utilizzate a fini terapeutici contro alterazioni non croniche, e non richiedono una vera e propria posologia come i farmaci normali”. Generalmente, nel linguaggio comune i termini “officinale” e



“medicinale” sono usati come sinonimi. In realtà, il primo ha un’eccezione puramente legale. Sotto la definizione di “aromatiche”, invece, sono racchiuse tutte quelle piante che contengono composti di odore gradevole e ricche di oli essenziali.

Nella Farmacopea Ufficiale Italiana (FUI) sono elencate più di 80 specie botaniche. per le quali sono riportati i tipi di droga, d’estratto e le modalità per l’ottenimento.

Da tempo immemorabile l’uomo ha ricercato nel mondo vegetale rimedi per curare le malattie e nell’ultimo decennio si è assistito ad una notevole domanda da parte dei consumatori: sono circa 15 milioni gli italiani che si curano con metodi naturali, alternativi, utilizzando le “erbe” per la prevenzione e la terapia. Per questo motivo, le piante officinali sono sempre più usate, solitamente come agenti terapeutici, spesso per la cura di malattie comuni. Il rivolgersi a rimedi, che per lungo tempo hanno costituito una base importante per la medicina popolare, si accompagna spesso alla convinzione che l’impiego delle piante medicinali sia “naturale” e produca, da una parte, effetti terapeutici superiori a quelli ottenuti dai farmaci di sintesi e, dall’altra, che non sia associato ad altrettanti effetti collaterali indesiderati (Voltolina e Visentin, 2001).

Negli ultimi trent’anni, gli studi fitochimici hanno subito un progresso enorme, grazie soprattutto a nuove tecniche che hanno consentito di spiegare le proprietà di molte droghe. Recenti studi hanno, infatti, valutato l’impiego di alcune erbe per la cura delle malattie più gravi, come il cancro (Nseyo *et al.*, 2005; Hafidh *et al.*, 2009), l’AIDS, la malaria, il diabete e i disordini mentali (Okigbo *et al.*, 2009). Inoltre, esistono numerosi studi atti a caratterizzare le varie droghe per la loro funzione antiossidante (Surveswaran *et al.*, 2007; Khalil *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2008) e nutraceutica (Shoji e Nakashima, 2004). Attualmente, le piante officinali sono utilizzate per preparati fitomedici, anche ad uso veterinario, aromaterapici, in numerose formulazioni per la cura personale, cosmetici, liquori, aromatizzanti per alimenti (Tabatabaei *et al.*, 2008).

In relazione a quanto sopra, si è assistito anche ad un notevole incremento degli studi botanici, etnobotanici, farmacognostici, farmacologici e medici, permettendo una collaborazione interdisciplinare, che ha portato una maggior conoscenza sulle piante medicinali e sulla loro azione. In particolare, la ricerca ha posto l’accento non solo sul principio attivo (la molecola), ma su tutti i composti apparentemente inerti che hanno un effetto coadiuvante l’attività del principio attivo stesso (Bruni, 1999).

Partendo dalle nozioni mediche egizie, già Greci e Romani fondarono la medicina basata sull’uso delle piante, iniziarono a commercializzarle e si posero il problema della

qualità delle droghe. Teofrasto (370 - 287 a.C.), Dioscoride (40 – 80 d.C.), Plinio il Vecchio (23 - 79 d.C.) e Galeno (129 - 210 d.C.) descrissero metodi basati sull'analisi delle proprietà organolettiche per valutare la qualità delle piante medicinali. Gli studi di Dioscoride e di Galeno costituirono le pietre miliari della medicina europea sino al 1800. L'introduzione verso il 1850 dell'analisi microscopica da parte dell'inglese Hassle aprì nuove prospettive di determinazione della qualità e delle adulterazioni. A seguito di tali studi il governo inglese emanò nel 1860 “*The first British Adulteration Act*”.

Come detto, l'interesse nella produzione delle piante officinali è in costante aumento. Proprio per questo motivo è necessario garantire l'alta qualità del prodotto, che deve essere ricercata nei differenti *step* del processo di produzione (Tabatabaei *et al.*, 2008). La domanda del consumatore di poter avere maggiori controlli sulla qualità e sulla sicurezza di un prodotto standardizzato si traduce però in una sfida spesso difficile e costosa (Tabatabaei *et al.*, 2008).

Infatti, ad oggi resta ancora difficile definire il concetto di “qualità”. Nessuno ha definito univocamente la qualità di una pianta officinale, perché in base alla destinazione o al fruitore finale il concetto è diverso.

La FUI prevede, per le droghe vegetali, tutta una serie di criteri che devono essere rispettati *in toto*, affinché il prodotto finale possa essere considerato di buona qualità. Già l'esame macro- e microscopico consente di identificare la specie e scoprire eventuali sofisticazioni e/o contaminazione da insetti, funghi o corpi estranei. Per effettuare un'approfondita analisi delle caratteristiche chimiche, le metodiche più moderne e più usate sono la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e la spettroscopia di massa (GC-MS), che consentono analisi quali-quantitative accurate, riproducibili e automatizzabili, con l'unico difetto del costo elevato (Bettaie *et al.* 2009; Fecka e Turek, 2007).

Nel 2003 l'OMS, in collaborazione con la Società Italiana di Fitoterapia, ha pubblicato un manuale dal titolo “Metodi per il controllo della qualità delle sostanze ricavate dalle piante medicinali” (A.A.V.V., 2003), con l'intento di uniformare i *test* atti a valutare la qualità dei prodotti medicinali vegetali, fornendo cioè le linee guida per una buona pratica agricola e di raccolta (GACP), ottimizzate per le piante medicinali. Le GACP sono norme di autoregolamentazione che cercano di fornire al produttore un valido aiuto per il controllo e la verifica del processo in tutte le sue fasi, al fine di ottenere un prodotto di qualità. Oltre ai metodi analitici, il manuale include alcuni suggerimenti riguardanti i limiti nell'uso di fitofarmaci. Questo è un delicato aspetto che riveste particolare importanza, considerando che allo stato attuale l'OMS non è in grado di definire direttive specifiche, date le troppe

differenze fra quelle adottate nei diversi Paesi e, per questo, non risultano stipulabili accordi validi a livello internazionale. Alla luce di queste considerazioni, si deduce quanto complesso possa essere definire il concetto di qualità. Govindaraghavan *et al.* (2012) hanno confermato quanto sopra, sostenendo che le caratteristiche e l'efficacia di un prodotto officinale sono strettamente legate alla qualità del materiale di partenza. Allo stesso tempo, la mancata armonizzazione delle linee guida internazionali, necessarie per la regolamentazione della produzione di farmaci a base di erbe, rappresenta un grande ostacolo per il raggiungimento della garanzia di qualità delle materie prime in tutto il mondo. Per esempio, anche se la medicina tradizionale cinese (MTC) sta diventando sempre più popolare in Europa, non c'è ancora omogeneità tra lo *status* giuridico europeo e quello asiatico, considerando anche le grandi differenze generali tra le Farmacopee internazionali. Questa situazione ha indotto la comunità europea a sviluppare monografie specifiche per le erbe provenienti dalla MTC (Bauer *et al.*, 2010)

Da quanto detto fino ad ora e tenuto conto che la qualità del prodotto finale deriva in buona parte dalle caratteristiche della droga d'origine, è possibile affermare che la miglior tendenza è quella di partire da coltivazioni omogenee, cresciute in assenza di contaminazioni e nel rispetto dell'eco-compatibilità ed eco-sostenibilità, qualunque sia l'uso finale che di esse se ne voglia fare. Risulta, comunque, chiaro che organismi vegetali cresciuti in presenza di qualunque tipo di *stress*, sia esso dovuto alle condizioni climatiche, di salinità del terreno o inquinamento, vedranno modificate le loro attività metaboliche, andando a influenzarne la composizione e, eventualmente, alterandone la qualità.

Negli ultimi decenni sono stati molti i laboratori di ricerca che hanno focalizzato l'attenzione sulle conseguenze dei danni provocati da *stress* su piante officinali. Abou El-Fadl *et al.* (1990b) hanno analizzato il caso di *Mentha arvensis*, sottoposta a *stress* salino: seppure la pianta mostrasse una crescita ridotta, la resa e il contenuto dei principi attivi nel suo olio essenziale subivano un notevole incremento. Studi simili sono stati condotti anche su *Ocimum basilicum* (El-Shafy *et al.*, 1991), *Salvia officinalis* (Hendawy e Khalid, 2005; Taarit *et al.*, 2010), *Rosmarinus officinalis* (Solinas e Deiana, 1996), *Melissa officinalis* (Ozturk *et al.*, 2004) e *Matricaria chamomilla* (Razmuo *et al.*, 2008).

Letchamo *et al.* (1995) hanno focalizzato l'attenzione sugli effetti che la qualità della luce e dell'approvvigionamento idrico possono indurre su piante di *Thymus vulgaris*; osservando un significativo incremento della biomassa secca e del contenuto totale in pigmenti fotosintetici, quando il timo veniva sottoposto ad un regime luminoso più elevato del

normale; *Withania somnifera*, meglio conosciuta come Ginseng indiano, sottoposta a *stress* luminoso e termico è stata oggetto di studio di Kambizi *et al.* (2006) che hanno dimostrato come la combiazione tra fotoperiodo e temperatura, poco differenti da quelle considerate ottimali per la pianta, possano inibire la germinazione.

Studiando gli effetti di *stress* abiotici sulla vegetazione è molto facile imbattersi in lavori che analizzano la presenza di contaminanti chimici, come i prodotti antiparassitari e, soprattutto, come i metalli pesanti. Negli ultimi anni sono state studiate alcune tecniche per l'eliminazione di questi elementi dal suolo, che possono alterare la qualità delle produzioni vegetali. La pericolosità deriva dalla loro capacità di avere diversi stati di ossidazione (che si traduce in una elevata reattività e in una grande facilità nel formare composti intermedi); essi sono, poi, ottimi catalizzatori di numerose reazioni biologiche e, a causa dei loro orbitali *d* spesso incompleti, possono dare origine a complessi; presentano, in generale, affinità notevole con i gruppi -SH degli aminoacidi e discreta con i loro gruppi carbossilici e amminici. Nelle cellule, questi agenti nocivi inibiscono a vario livello l'attività di molti enzimi e alcuni di essi (rame, cromo e nichel) inducono *stress* ossidativo (Baier *et al.*, 2005). Il DNA rappresenta il bersaglio primario, a causa dei numerosi siti di interazione che esso offre. Essi sono altresì responsabili di interferenze nell'assimilazione e nel metabolismo di cationi essenziali per la nutrizione vegetale.

A tal proposito, vengono riportati alcuni dei più significativi lavori condotti su piante officinali. Nguyen *et al.* (2005) hanno osservato riduzione di crescita, clorosi e necrosi fogliare in individui di *Eucalyptus camaldulensis* esposte a eccesso di alluminio; piante di *Coriandrum sativum*, cresciute in eccesso di cadmio, subiscono alterazioni della morfologia fogliare e decremento nel numero di infiorescenze (De Pasquale *et al.*, 1995). Rai *et al.* (2004) riferiscono che in *Ocimum tenuiflorum*, in presenza di cromo, si verifica un calo di biomassa e produzione di pigmenti. Andamento simile è stato suggerito su erbe officinali sottoposte ad alte concentrazioni di rame (Khatun *et al.*, 2008), piombo (Farooqi *et al.*, 2009) e zinco (Zheljazkov *et al.*, 1996).

Per quel che riguarda gli inquinanti atmosferici, come l'O<sub>3</sub>, molta attenzione è stata rivolta a specie vegetali di interesse economico (in campo agricolo, ortivo e forestale) in virtù dall'ampia variabilità di risposta a livello sia inter- che intra-specifico. Infatti, in presenza di contaminanti gassosi, numerose piante manifestano specifici cambiamenti in termini morfologici, fisiologici e biochimici (Heath, 2008; Zouzoulas *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010).

I criteri di valutazione dell'impatto degli inquinamento atmosferico sulla vegetazione includono (i) analisi di danni visibili (Bussotti *et al.*, 2003b; Bussotti e Ferretti, 2009), (ii) accumulo di sostanze tossiche e (iii) stima dei cambiamenti di parametri, quali: fotosintesi, respirazione, attività enzimatica, sintesi dei lipidi, proteine e altri metaboliti (Herbinger *et al.*, 2002). La conoscenza a livello molecolare dei meccanismi che sono alla base della tolleranza ai fattori ambientali può contribuire fortemente allo sviluppo di nuove varietà o nuovi metodi che aumentano la qualità, la sicurezza e la produttività.

E' noto ormai che gli effetti indotti dall'O<sub>3</sub> sono caratterizzati da un'ampia divergenza sintomatica, cosicché il colore e la distribuzione delle lesioni possono variare anche in maniera sostanziale da una specie all'altra (cfr. par. 1.2.) e non solo. Quanto affermato è in accordo con i risultati riportati da Langebartels *et al.* (2002) in *Malva sylvestris* esposta a trattamento acuto con O<sub>3</sub> (310 ppb, 5 ore per due giorni consecutivi).

Ad oggi, l'impiego di tecniche rapide e non invasive consente di rilevare non solo l'effetto dell'O<sub>3</sub> a lungo termine, ma anche in fase precoce, prima della comparsa del sintomo. Sebbene questi parametri non siano sempre facilmente interpretabili, poiché largamente influenzati dai fattori ambientali (temperatura, umidità relativa, *etc*), questi possono essere considerati *marker* della risposta fisiologica e biochimica all'inquinante.

Ad oggi, pochi Autori hanno preso in esame i possibili effetti macroscopici, le risposte biochimiche e fisiologiche di piante officinali esposte a O<sub>3</sub>: solo per una piccola percentuale di specie è stata stabilita la sensibilità rispetto a questo inquinante (Dawnay e Mills, 2009). Di seguito, sono riportate le principali piante officinali oggetto di studi in questo ambito: *Lythrum salicaria*, *M. aquatica*, *Rumex acetosa*, *Valeriana officinalis* (Power e Ashmore, 2002), *Achillea millefolium*, *Anthyllis vulneraria*, *Hieracium pilosella*, *Hypericum perforatum*, *Plantago lanceolata*, *P. major*, *Trifolium pratense* (Scebba *et al.*, 2006), *Laurus nobilis* (Nali *et al.*, 2004), *Senecio vulgaris*, *Malva parviflora*, *Medicago sativa* e *Melilotus incidus* (El-Khatib, 2003), *Ocimum basilicum* (Baczek-Kwinta, 2002; Blum e Didyk, 2007), *Ailanthus altissima* (Gravano *et al.*, 2003), *M. spicata* (Nali *et al.*, 2006), *M. officinalis* (Pellegrini *et al.*, 2011a).

Baczek-Kwint (2002) ha analizzato gli effetti di un'esposizione acuta a O<sub>3</sub> (140 ppb, 5 ore) sulla *performance* fotosintetica di tre specie appartenenti alla famiglia delle *Labiatae* (*O. basilicum*, *M. officinalis*, *Salvia officinalis*). Dopo otto giorni dal termine del trattamento, in assenza di danni macroscopici, nelle piante di melissa si registrava una significativa diminuzione dell'efficienza fotochimica ottimale del PSII (rappresentata dal rapporto F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>,

stimabile intorno a -94% rispetto ai controlli). Simili risultati sono stati ottenuti da Pellegrini *et al.* (2011a) analizzando le risposte ecofisiologiche in piante di *M. officinalis* sottoposte a trattamento acuto con O<sub>3</sub> (200 ppb, 5 ore). In questa analisi è stata osservata (i) la comparsa del sintomo fogliare a 48 ore dall'inizio della fumigazione (ii) una riduzione della conduttanza stomatica e del ritmo di fissazione della CO<sub>2</sub> con successivo accumulo nella camera sottostomatica, (iii) un aumento del contenuto in pigmenti accessori legati al ciclo delle xantofille e all'indice di depossidazione (DEPS), a conferma di una marcata attivazione di meccanismi fotoprotettivi specifici.

In uno studio sperimentale condotto da Nali *et al.* (2006) su giovani piante di *M. spicata* subsp. *glabrata* esposte ad un trattamento cronico con O<sub>3</sub> (100 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup>, per 21 giorni consecutivi), è stata evidenziata, già dopo due settimane di esposizione, una significativa alterazione dei parametri fisiologici (come riduzione dei livelli di fissazione di CO<sub>2</sub> stimabile intorno a -85% rispetto ai controlli e calo della conduttanza stomatica, con valori intorno a -92% rispetto alle piante mantenute in aria filtrata), sebbene gli esemplari trattati non manifestassero alcun sintomo fogliare.

### 1.4. Scopo del lavoro

Le piante officinali rappresentano un'importante fonte di molecole naturali biologicamente attive per usi terapeutici e, più in generale, industriali per le quali da tempo si cercano su larga scala migliori e più proficue tecniche di produzione. Molte ricerche hanno da tempo dimostrato come tali composti rivestano un significativo ruolo quali fattori di resistenza nei confronti di *stress* biotici e abiotici e possano pertanto essere biosintetizzate *ex-novo* e/o a più alti livelli se opportunamente indotti.

Alla luce di tali considerazioni e assumendo che l'O<sub>3</sub> sia capace di potenziare la complessa risposta difensiva delle piante (Sandermann *et al.*, 1998), il lavoro di ricerca condotto nel corso di questo triennio di dottorato è stato incentrato sulle interazioni *M. officinalis*-O<sub>3</sub>, valutando in particolare alcuni dei principali meccanismi attivati progressivamente nel tempo a più livelli (morfologico, fisiologico e biochimico-molecolare), capaci di coinvolgere tanto il metabolismo primario quanto quello secondario.

All'uopo piante di melissa in ottimo stato sanitario, in pre-fioritura, ottenute da seme, sono state sottoposte a fumigazioni artificiali con l'inquinante fotochimico in ambiente controllato, riproducenti un trattamento puntiforme (200 ppb, 5 ore) e cronico (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> 35 giorni consecutivi).

Le analisi condotte in vivo e in *vitro*, utilizzando una pluralità di tecniche, sono state ripetute all'inizio della sperimentazione e in corrispondenza di precisi intervalli temporali come suggerito da lavori già presenti in bibliografia (Kangasjärvi *et al.* 2005) (1, 2, 5, 8, 24, 48 ore per la prova puntiforme; settimanalmente per il cronico), al fine di monitorare le modalità e le intensità delle reazioni indotte.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1. Allevamento del materiale vegetale

Sono state utilizzate piante di *M. officinalis* ottenute da seme presso l'Azienda Agricola Picchi con sede a Torre del Lago (LU), uniformi in taglia e allevate in vasi di plastica 15 x 15 cm contenenti un miscuglio di terreno di bosco e torba (1:1, v/v). Il materiale è stato acclimatato presso le strutture del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali (ex Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose "Giovanni Scaramuzzi") dell'Università di Pisa in camere di crescita a  $20 \pm 1$  °C,  $85 \pm 5\%$  di U.R.,  $530 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  di radiazione fotosinteticamente attiva (PAR:  $\lambda = 400\text{-}700$  nm) con almeno 14 ore di fotoperiodo, in aria filtrata e in ottime condizioni di approvvigionamento idrico.

### 2.2. Fumigazioni con ozono

#### 2.2.1. Esposizioni puntiformi

L'impianto per il trattamento artificiale delle piante all'O<sub>3</sub> è costituito da una cella climatica (Bertagnin, Proclimatic, Italia), con dimensioni utili di 2,70 x 2,90 x 2,00 m, all'interno della quale i parametri ambientali (luce, temperatura, U.R. e fotoperiodo) vengono mantenuti su valori scelti attraverso sistemi automatici di controllo. In essa si trova una camera in *perspex* (1,30 x 0,75 x 1,00 m) ventilata continuamente con aria proveniente dalla cella stessa, che viene immessa in continuo con un flusso di ricambio totale capace di garantire due cambi di aria al minuto, previa filtrazione attraverso carbone attivo. L'ingresso dell'aria nella camera avviene attraverso cinque fori (0,05 m di diametro), disposti su uno dei lati minori ed è mediato dalla presenza di una piastra in *perspex*, anch'essa forata, che, rompendo i filetti di aria in ingresso, ne assicura una soddisfacente omogeneizzazione. Ad ogni ricambio, l'aria viene aspirata verso un'apertura (0,1 m di diametro) praticata dal lato opposto a quello di entrata ed immessa all'esterno mediante un aspiratore-depuratore (Maczero Toxigas 900, Aeron, Italia). Il flusso viene intercettato, ad una distanza di 0,4 m dal punto di ingresso nella camera, da un tubetto in teflon (0,005 m di diametro), che convoglia il contaminante all'interno della cella, consentendo un'adequata miscelazione con la massa d'aria in entrata.

L'O<sub>3</sub> viene generato a partire da O<sub>2</sub> puro in bombola, attraverso la scarica elettrica prodotta da uno specifico generatore (Fisher 500, OG-Series, USA) raffreddato ad aria; la sua quantità in uscita è funzione dell'intensità della scarica elettrica e del flusso di gas in entrata al generatore. La concentrazione dell'inquinante all'interno della camera è misurata in



continuo. La miscela aria-O<sub>3</sub>, campionata mediante un tubetto in *teflon* posto all'altezza delle piante, è convogliata ad un analizzatore automatico (Monitor Labs, mod. 8810, USA) funzionante in base al principio dell'assorbimento della radiazione UV. Lo strumento è connesso ad un sistema computerizzato basato su un PC, con specifico *software*. Il protocollo seguito è riportato da Francini *et al.* (2008).

Quaranta giorni dopo la semina le piante mostravano crescita omogenea ed un'altezza pari a circa 20-25 cm. Gli individui selezionati in maniera del tutto casuale sono stati esposti a 200 ppb per 5 ore consecutive (dalle 9:00 alle 14:00 ora solare) ed i campionamenti sono stati effettuati dopo 1 e 2 ore dall'inizio del trattamento, alla fine di esso e nel periodo di *recovery* (8, 24 e 48 ore sempre dall'inizio del trattamento). Il materiale è stato conservato a -80 °C fino al momento delle analisi.

### **2.2.2. Esposizioni croniche**

L'impianto di fumigazione utilizzato per il trattamento cronico con O<sub>3</sub> è costituito da quattro *box* in *perspex* di dimensioni utili di 1,50 x 1,50 x 1,00 m, nei quali le condizioni ambientali (luce, temperatura, U.R. e fotoperiodo) sono quelle naturali e tipiche del periodo di analisi. Per i dettagli sulle modalità di fumigazione si rimanda al par. 2.2.1. All'interno di due di essi sono state disposte piante omogenee allo stadio fenologico di prefioritura, in maniera casuale rispetto alle tesi di appartenenza (altrettante sono state mantenute in due *box* con aria filtrata e utilizzate come materiale di controllo) e sono state esposte a 80 ppb di O<sub>3</sub> per 5 ore (dalle 9.00 alle 14.00, ora solare), per 35 giorni consecutivi fino al raggiungimento della fioritura. Le analisi fisiologiche e biochimiche sono state eseguite all'inizio della fumigazione e dopo 7, 14, 21, 28 e 35 giorni di esposizione, in corrispondenza di un AOT40 pari a 1400, 2800, 4200, 5600 e 7000 ppb h<sup>-1</sup>. A questi stessi tempi di misura, campioni di materiale vegetale sono stati prelevati e posti immediatamente in N<sub>2</sub> liquido, quindi conservati a -80 °C fino alle successive analisi di laboratorio.

### **2.3. Analisi dei sintomi fogliari**

Dopo 24 e 48 ore dal termine dell'episodio puntiforme e durante (con cadenza settimanale) e alla fine della fumigazione cronica è stata valutata la manifestazione sintomatica. Ad ogni rilievo, ciascuna pianta è stata classificata come sintomatica o non in base alla presenza o assenza delle lesioni. In entrambi i casi, ciascuna delle 10 foglie individuate su 8 piante trattate e altrettante di controllo, è stata attribuita la percentuale di necrosi fogliare, espressa in

classi del 5%. Sono stati identificati come tipici sintomi attribuibili all'O<sub>3</sub> le punteggiature (*stipples*) bruno-scure, internervali, presenti sulla superficie adassiale (superiore) della foglia, secondo quanto definito nel protocollo del *Working Group on Air Quality* (UN/ECE, 2004) e riferendosi alla guida fotografica di Innes *et al.* (2001).

## 2.4. Verifica dell'integrità delle membrane

Le analisi sono state condotte sul materiale vegetale esposto a episodio puntiforme a 5, 24 e 48 ore dal termine della fumigazione e con cadenza settimanale negli individui sottoposti a fumigazione cronica, per tutti i 35 giorni di trattamento.

### 2.4.1. Analisi della perossidazione lipidica tramite saggio dell'acido tiobarbiturico

La perossidazione lipidica delle membrane è stata determinata mediante l'analisi del contenuto in malondialdeide (MDA, prodotto della perossidazione), utilizzando il saggio dell'acido tiobarbiturico (TBARS), come riportato da Hodges *et al.* (1999). Sono stati prelevati campioni fogliari (1 g) omogeneizzati con 2,5 ml di acido tricloroacetico (TCA) allo 0,1% e centrifugati a 10000 g per 10'. In seguito, è stato prelevato 1 ml di surnatante a cui sono stati aggiunti 4 ml di TCA al 20% e 0,025 di acido tiobarbiturico (TBA) allo 0,5%. La soluzione, poi, è stata scaldata a 95 °C per 30' e successivamente raffreddata in ghiaccio. I campioni sono stati nuovamente centrifugati a 10000 g per 10' a 22 °C. Il surnatante è stato usato per determinare la concentrazione di MDA alle lunghezze d'onda di 532 nm e 600 nm con uno spettrofotometro (6505 UV-Vis, Jenway, UK). La quantità equivalente di MDA è stata calcolata usando un coefficiente di estinzione molare di 157 mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, secondo l'equazione:

$$\begin{aligned} \text{TBARS (nmol ml}^{-1}\text{)} &= (A-B/157000)*10^6 \\ \text{Con } A &= [(A_{532+\text{TBA}}) - A_{600+\text{TBA}}] - (A_{532-\text{TBA}} - A_{600-\text{TBA}}) \\ \text{e } B &= [(A_{400+\text{TBA}} - A_{600+\text{TBA}}) 0,0571] \end{aligned}$$

### 2.4.2. Conducibilità elettrica di porzioni fogliari

La misurazione della conducibilità elettrica (CE) è stata effettuata utilizzando il metodo di Beckerson e Hofstra (1980), apportando alcune modifiche. Sono stati prelevati 30 dischetti fogliari (Ø 0,8 cm) da aree prive di nervature e lavati per 10' con H<sub>2</sub>O distillata al fine di eliminare gli elettroliti rilasciati dalla superficie di taglio e dalla rottura cellulare. Dopo averli tamponati con carta assorbente per rimuovere H<sub>2</sub>O distillata in eccesso, i dischetti sono stati

posti in una provetta contenente 25 ml di H<sub>2</sub>O distillata e lasciati in agitazione a temperatura ambiente per 4 ore, in modo da migliorare la diffusione degli elettroliti in soluzione. È stato poi misurato tramite conducimetro (CM 35 Crison Instruments Alella, Spagna) il valore di CE (M1).

Tutte le provette sono state quindi collocate a -20 °C per una notte, al fine di indurre la rottura delle membrane cellulari e il conseguente rilascio totale degli elettroliti. A seguito di scongelamento a temperatura ambiente, si è proceduto ad un ulteriore rilievo della CE (M2). I risultati sono stati, infine, espressi in base al rapporto percentuale di CE = (M1/M2)\*100.

#### **2.4.3. Contenuto idrico relativo di dischetti fogliari**

Il contenuto idrico relativo (RWC) è stato misurato, in base al protocollo di Barrs e Weatherby (1962), su dischetti fogliari (Ø 0,8 cm) per un totale di tre per foglia e tre ripetizioni per pianta. Dopo la registrazione del peso fresco (FW), i dischetti sono stati posti in capsule Petri, contenenti carta bibula satura di H<sub>2</sub>O distillata, e conservate al buio a 4 °C, allo scopo di ridurre al minimo le variazioni di peso dovute all'eventuale attività metabolica. Dopo 24 ore, si è proceduto ad un'altra stima del peso, al fine di calcolare quello turgido (TW) e, una volta disseccati (in stufa a 80 °C per 48 ore), alla determinazione di quello secco (DW). L'RWC è stato derivato sulla base della seguente formula:

$$\text{RWC (\%)} = [(\text{FW}-\text{DW})/(\text{TW}-\text{DW})]*100$$

### **2.5. Analisi ecofisiologiche**

Le analisi ecofisiologiche sono state condotte sulle piante esposte a fumigazioni sia acute che croniche, con la tempistica precedentemente descritta (cfr. par. 2.4.).

#### **2.5.1. Scambi gassosi fotosintetici**

Questa tecnica viene adottata per lo studio della fotosintesi *in vivo* e offre la possibilità di eseguire analisi di tipo non distruttivo sulla foglia. I parametri degli scambi di H<sub>2</sub>O<sub>(vap)</sub> e anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) sono stati analizzati mediante un sistema aperto (CIRAS-2, PP-Systems, USA) costituito da un analizzatore differenziale a raggi infrarossi, collegato ad una camera fogliare tipo *Parkinson*, capace di effettuare misurazioni sulla singola foglia. Le determinazioni sono state effettuate seguendo il protocollo di Francini *et al.* (2007), a concentrazione ambiente di CO<sub>2</sub> (340-360 ppm) e U.R. dell'80%; la camera è stata illuminata con lampada alogena a quarzo e la temperatura della foglia mantenuta a 26±0,4 °C. L'attività

fotosintetica a luce saturante ( $A_{\max}$ ) è stata misurata a 1500  $\mu\text{mol}$  di fotoni  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e il calcolo della  $C_i$  è stato effettuato sulla base dell'equazione descritta da von Caemmerer e Farquhar (1981).

E' stata, inoltre, effettuata la determinazione delle curve luce e delle curve  $A/C_i$ . Nel primo caso, la porzione di foglia inserita nella camera di assimilazione veniva sottoposta a intensità luminose crescenti, da valori di 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  salendo gradualmente fino a 1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , cioè a livello di saturazione luminosa. Nel secondo, la relazione tra la capacità fotosintetica e la concentrazione intercellulare di  $\text{CO}_2$  è stata determinata misurando l'attività fotosintetica che corrisponde a concentrazioni esterne di  $\text{CO}_2$  da 0 a 1000 ppm, mantenendo l'intensità luminosa a 1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Dall'analisi dello *slope* iniziale di questa curva è stato possibile ricavare la velocità massima di carbossilazione della Rubisco *in vivo* ( $V_{\text{cmax}}$ ), la massima velocità di respirazione mitocondriale diurna ( $R_d$ ) e il massimo ritmo di trasporto elettronico ( $J_{\text{max}}$ ) necessario per la rigenerazione del substrato ribulosio-1,5bisfosfato (RuBP) (Long e Bernacchi, 2003).

### 2.5.2. *Fluorescenza della clorofilla a*

Le analisi della fluorescenza della clorofilla *a* sono state effettuate mediante un fluorimetro a luce modulata PAM-2000 (Walz, Effeltrich, Germania) sulle stesse foglie adoperate per gli scambi gassosi dopo averle adattate al buio per 20', al fine di garantire la completa ossidazione dell'accettore primario del PSII ( $Q_A$ ).

La fluorescenza minima,  $F_0$ , è stata determinata usando la misurazione della luce modulata quando tutti i centri di reazione del PSII sono aperti. La luce modulata ha un'intensità abbastanza bassa ( $<1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), tale da non indurre emissione di fluorescenza variabile, ma solo di  $F_0$ . Il livello massimo di fluorescenza,  $F_m$ , calcolato quando tutti i centri del PSII sono chiusi, è determinato esercitando un'elevata intensità luminosa (0,8'') a 8000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in foglie adattate al buio. Dai parametri così determinati si ottiene il rapporto  $F_v/F_0 = [(F_m - F_0)/F_0]$ .

La foglia è stata poi sottoposta a luce attinica (circa 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), che attiva il processo fotosintetico e il trasporto elettronico. In presenza di un'intensità luminosa elevata 10000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a intervalli di 20'' viene determinata la fluorescenza massima nella fase di adattamento alla luce ( $F'_m$ ). La fluorescenza minima nello stadio adattato alla luce ( $F'_0$ ) è stata determinata subito dopo spegnendo la sorgente di luce attinica, in presenza di una base nel rosso lontano ( $>710 \text{ nm}$ ) per 10'', per assicurare l'ossidazione massima degli accettori di

elettroni del PSII. Il metodo con impulso saturante è stato adottato per le analisi del *quenching* fotochimico ( $q_P$ ) e non fotochimico ( $q_{NP}$ ) come descritto da Schreiber *et al.* (1986). Il valore di  $\Phi_{exc}$  ( $F'_v/F'_m$ ) corrisponde alla stima dell'efficienza dell'energia di eccitazione trasferita agli accettori aperti del PSII (dove  $F'_v$  viene calcolato come differenza tra  $F'_m$  e  $F'_0$  durante la fase di adattamento alla luce). Quando la frazione di  $Q_A$  ossidati è in equilibrio con quella di  $Q_A$  ridotti, si raggiunge lo *steady-state* della fotosintesi e il valore della fluorescenza è detto  $F_t$ . La resa quantica effettiva del PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) viene calcolata mediante la seguente equazione:

$$\Phi_{PSII} = (F'_m - F_s)/F'_m$$

in cui  $F_s$  è la misura di fluorescenza durante la fase di adattamento alla luce (Rohacek, 2002). Il tasso di trasporto apparente degli elettroni attraverso il PSII (*Electron Transport Rate* ETR) è calcolato come:

$$ETR = q_P * \Phi_{PSII} * PFD * 0,5 * 0,84$$

I dettagli della procedura sono riportati in Pellegrini *et al.* (2011a). Il coefficiente del *quenching* fotochimico ( $q_L$ ) è la misura della frazione dei centri di reazione aperti del PSII, basato sul modello antenna che è definito da Kramer *et al.* (2004) come:

$$q_L = (q_P * F'_0)/F_s$$

## 2.6. Estrazione e determinazione del contenuto in pigmenti fotosintetici

Le analisi sono state condotte sul materiale vegetale derivante da esposizioni sia acute che croniche, con la tempistica precedentemente descritta (cfr. par 2.4.).

L'estrazione dei pigmenti è stata effettuata su campioni congelati in  $N_2$  liquido e conservati a  $-80^\circ C$  fino al momento dell'analisi, secondo il metodo di Kevers e Gaspar (1985). Frazioni di campione di circa 30 mg sono state poste in 3 ml di metanolo puro per HPLC, per 12 ore. L'estratto è stato, poi, filtrato mediante un filtro satellite da  $0,2 \mu m$  in PVDF ed immediatamente analizzato. Tutto il procedimento di estrazione è stato eseguito al buio per evitare la fotodegradazione dei pigmenti. Il contenuto di clorofilla *a* e *b* e di carotenoidi è stato determinato mediante HPLC (Dionex, Germania), registrando i picchi in uscita a  $\lambda = 445$  nm. La separazione è stata condotta utilizzando una colonna Dionex, Acclaim 120, C18, la cui fase mobile è costituita da due diverse soluzioni, acetonitrile/metanolo 75/25 v/v (soluzione A) e metanolo/etilacetato 68/32 v/v (soluzione B). Il programma di eluizione prevedeva 15' in 100% soluzione A, 2' e 30'' in gradiente da 100% soluzione A a 100% soluzione B, 13' e 30'' in 100% soluzione B, infine 2' in gradiente da 100% soluzione B a 100% soluzione A. Durante la fase di separazione il flusso delle soluzioni è stato mantenuto a

1 ml min<sup>-1</sup> (modificato da De las Rivas *et al.*, 1989). La quantificazione dei pigmenti è stata effettuata in base a rette di calibrazione costruite per ogni *standard* utilizzato (clorofilla *a* e *b*, zeaxantina,  $\beta$ -carotene). La quantificazione di violaxantina e anteraxantina è stata ottenuta dalla retta di calibrazione della zeaxantina.

### 2.7. Contenuto in zuccheri solubili e amido

Il contenuto in carboidrati solubili (glucosio, fruttosio, saccarosio) e insolubili (amido) è stato analizzato e quantificato secondo il protocollo messo a punto da Keutgen *et al.* (2005) con opportune modifiche. I campioni, provenienti dalle piante esposte a trattamento cronico, sono stati congelati in N<sub>2</sub> e conservati a -80 °C fino al momento dell'analisi. Il materiale vegetale (0,3 g) è stato macinato in un mortaio con N<sub>2</sub> liquido e alla polvere così ottenuta sono stati aggiunti 5 ml di H<sub>2</sub>O per HPLC; il tutto è stato posto in agitazione per 1 ora a 60 °C. Successivamente l'omogenato è stato centrifugato a 5000 g per 20' a temperatura ambiente; il surnatante è stato poi recuperato e iniettato in HPLC per la separazione dei singoli composti.

Per l'identificazione del contenuto in amido, il precipitato residuo è stato sottoposto a successiva estrazione mediante l'uso di 4 ml di tampone acetato nel quale sono stati disciolti 50  $\mu$ l di enzima amiloglicosidasi. L'attività di questo enzima, espletata mediante incubazione a 60 °C per 20 ore, consente la trasformazione dell'amido insolubile in glucosio, misurabile nel surnatante dopo centrifugazione a 5000 g per 20' a temperatura ambiente.

In entrambi i casi, per la separazione è stata utilizzata una colonna 300 x 8 mm Sugar SC1011, equipaggiata da una precolonna 50 x 6 mm Sugar SC-LG (Showa Denko, Giappone). Gli zuccheri eluiti vengono riconosciuti da un *detector* a indice rifrattometrico (LC 30-RI, Perkin Elmer, USA) a 28 °C. La temperatura della colonna è stata mantenuta a 80 °C e la fase mobile era costituita da H<sub>2</sub>O con flusso di 1 ml min<sup>-1</sup>. La somma di glucosio, fruttosio e saccarosio corrisponde al contenuto totale in carboidrati solubili, mentre la somma di carboidrati solubili e amido è misura del contenuto di carboidrati totali.

Il riconoscimento degli analiti di interesse è stato effettuato in corrispondenza dei picchi di massimo assorbimento, per confronto dei tempi di ritenzione con i relativi *standard*.

### 2.8. Vitalità cellulare e localizzazione *in situ* di acqua ossigenata

Dopo 48 ore dall'inizio della fumigazione acuta, foglie sintomatiche sono state campionate allo scopo di condurre saggi *in vivo*, al fine di saggiare la vitalità cellulare e di localizzare i siti di accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguendo il protocollo di Iriti *et al.* (2003). Con l'ausilio di un

bisturi, sono state ricavate porzioni di circa 1 cm<sup>2</sup> di area fogliare, avendo avuto preventivamente cura di eliminare la nervatura principale e i margini. Per verificare la vitalità cellulare, le sezioni sono state immerse per 1' in una miscela colorante bollente composta da una soluzione di *Blue Evans* in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> distillata (20 mg ml<sup>-1</sup>), fenolo, acido lattico e glicerolo, nel rapporto volumetrico 1:1:1:1 (preparata immediatamente prima dell'uso). Al termine, dopo un preliminare risciacquo (per tre volte) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e con una soluzione diluita di cloralio idrato (2,5 mg ml<sup>-1</sup>), i frammenti sono stati lasciati a decolorare per tutta la notte in una soluzione di cloralio idrato più concentrata (2,5 g ml<sup>-1</sup> in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> distillata). I preparati, montati su vetrino, sono stati osservati al microscopio ottico (DM4000B, Leica, Germania).

Per visualizzare *in vivo* i siti di accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sezioni di lamina fogliare analoghe alle precedenti sono state sottoposte a colorazione con 3,3-diaminobenzidina (DAB). Dopo essere state immerse per 8 ore in una soluzione acquosa di DAB (1 mg ml<sup>-1</sup>), portata a pH 5,6 con NaOH, le porzioni sono state risciacquate in alcool a 70 °C e chiarificate con una soluzione decolorante di cloralio idrato (2,5 g ml<sup>-1</sup>). Le sezioni, montate su vetrino, sono state osservate al microscopio ottico, come descritto in precedenza.

### **2.9. Determinazione del contenuto in acqua ossigenata e anione superossido**

Il contenuto fogliare di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stato determinato sul materiale vegetale derivante sia dall'esposizione puntiforme (a 1, 2, 5, 8, 24 e 48 ore dall'inizio della fumigazione) che dalla fumigazione cronica con cadenza settimanale.

mediante l'uso della sonda fluorimetrica 10-acetil-3,7-diidrossifenoxazina (*Amplex Red*, Molecular Probes, UK), particolarmente sensibile a basse concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mohanty *et al.*, 1997), con cui reagisce in rapporto stechiometrico 1:1, formando resofurina, un prodotto di ossidazione fluorescente.

Il materiale vegetale (0,06 g) è stato macinato in un mortaio precedentemente raffreddato con N<sub>2</sub> liquido. Alla polvere così ottenuta sono stati aggiunti 400 µl di tampone potassio/fosfato (K/P, 20 mM), pH 6,5. Dopo centrifugazione a 12.000 g per 15' a 4 °C, 50 µl del surnatante sono stati utilizzati per misurare il contenuto in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> secondo il protocollo *Amplex Red Hydrogen peroxide/peroxidase assay kit* (Molecular Probes), in accordo con Shin *et al.* (2005). Gli estratti sono stati incubati e mantenuti in continua agitazione per 30' a 25 °C in assenza di luce. L'emissione della resofurina è stata determinata a 590 nm dopo eccitazione a 530 nm mediante uno spettrofluorimetro a piastre (Victor3 1420 Multilabel Counter, Perkin

Elmer,USA). La concentrazione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  è stata calcolata in riferimento ad una curva *standard* (0-3,5  $\mu\text{M}$ ).

La determinazione di  $\text{O}_2^-$  è stata effettuata su foglie derivanti dal singolo episodio puntiforme e campionate a 1, 2, 5, 8, 24 e 48 ore dall'inizio della fumigazione, secondo il metodo riportato da Able *et al.* (1998) con alcune modifiche. Il materiale vegetale (circa 0,5 g) è stato macinato in mortaio precedentemente raffreddato con  $\text{N}_2$  liquido. Per l'estrazione è stato utilizzato 1 ml di tampone Tris-HCl (50 mM) pH 7,5. L'estratto è stato, poi, centrifugato a 12000 g per 15' a 4 °C. Il surnatante (100  $\mu\text{l}$ ) è stato aggiunto a 2890  $\mu\text{l}$  di tampone di estrazione e a 10  $\mu\text{l}$  di 2,3-bis-(2-metossido-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolo-5-carboxanilide (XTT) 0,5 mM. La determinazione della riduzione dell'XTT è stata effettuata attraverso la misurazione dell'assorbanza a 470 nm. La quantità di  $\text{O}_2^-$  è stata definita utilizzando il coefficiente di estinzione molare  $2,16 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### **2.10. Determinazione dell'attività della superossido dismutasi**

L'attività della superossido dismutasi (SOD) è stata indagata su materiale campionato durante e dopo il singolo episodio puntiforme utilizzando il metodo di Lomonte *et al.* (2010). Il materiale vegetale (0,25 g) è stato macinato in mortaio precedentemente raffreddato con  $\text{N}_2$  liquido. Per l'estrazione sono stati utilizzati 3 ml di tampone K/P (50 mM), pH 7,8. L'estratto è stato, poi, centrifugato a 12000 g per 15' a 4 °C. All'estratto (10-30  $\mu\text{l}$ ) è stata aggiunta una miscela costituita da EDTA bisodico ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) 0,1 mM, metionina 13 mM, nitroblu di tetrazolo (NBT) 75  $\mu\text{M}$  e riblofavina 2  $\mu\text{M}$ . Un *set* di campioni è stato mantenuto al buio e un altro è stato esposto alla luce di una lampada al tungsteno (Osram R 80) da 150 W per 10'. Al termine della reazione colorimetrica è stata letta l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 560 nm. Un'unità di SOD è stata calcolata come i microlitri di estratto necessari a ridurre del 50% l'inibizione di NBT presente in 1 ml di soluzione.

Il contenuto totale in proteine è stato determinato seguendo il protocollo descritto da Bradford (1976), utilizzando il *Protein Assay kit II* (BIORAD). Sono stati preparati: il bianco (0,2 ml BIORAD non diluito, 0,8 ml di  $\text{H}_2\text{O}$ ) e quattro repliche per ogni campione (5  $\mu\text{l}$  di estratto enzimatico, 0,195 ml di BIORAD non diluito, 0,8 ml di  $\text{H}_2\text{O}$ ). Dopo aver agitato energicamente, è stata lasciata avvenire la reazione per 10' a temperatura ambiente e, successivamente, è stata determinata l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 595 nm, contro il bianco. La concentrazione proteica è stata ottenuta dalla retta di calibrazione, usando siero albumina bovina (BSA) come *standard*. La curva di taratura ottenuta aveva la seguente



equazione:  $y = 0,0631x + 0,0112$  ( $R^2 = 0,9954$ ), dove  $y$  indica l'assorbanza ed  $x$  la concentrazione delle proteine ( $\text{mg ml}^{-1}$ ).

### 2.11. Determinazione del contenuto degli acidi salicilico e jasmonico

L'estrazione di acido salicilico (SA) è stata effettuata su materiale campionato durante e dopo il singolo episodio puntiforme, secondo il protocollo di Szalai *et al.* (2011) su tessuto vegetale (circa 1,5 g) macinato in mortaio precedentemente raffreddato con  $\text{N}_2$  liquido, aggiungendo 2 ml di una soluzione di metanolo 70% contenente 250 ng di acido orto-anisico (*o*-ANI, utilizzato come *standard*) e 25  $\mu\text{g}$  di acido para-idrossibenzoico (*p*-HBA, impiegato come *carrier* di estrazione). L'estratto è stato, poi, centrifugato a 10000 g per 20' a temperatura ambiente. Il *pellet* è stato nuovamente risospeso in 2 ml di metanolo 90% e sottoposto a centrifuga (alle condizioni precedenti), mentre i surnatanti sono stati filtrati (filtro a satellite da 0,2  $\mu\text{m}$  in PVDF) e portati a secco in modo da far evaporare (ad una temperatura di 30-40 °C) i residui di metanolo in essi presenti. Successivamente, al concentrato è stato aggiunto 1 ml di TCA 5% (w/v) ed il tutto è stato posto in centrifuga (15000 g per 10' a temperatura ambiente). Una volta recuperato il surnatante, sono stati addizionati per due volte consecutive 3 ml di una soluzione etil acetato/cicloesano (in rapporto 1:1 v/v). La fase acquosa è poi stata idrolizzata mediante l'aggiunta di una miscela costituita da 250 ng *o*-ANI, 25  $\mu\text{g}$  *p*-HBA e 1,3 ml HCl 8 N e incubata a 80 °C per 60'; tale procedimento è stato ripetuto due volte. Il contenuto in SA è stato determinato mediante HPLC in fluorescenza, registrando i picchi in uscita a 295 nm di eccitazione e 405 nm di emissione. La separazione è stata condotta utilizzando una colonna Dionex (Acclaim 120, C18), la cui fase mobile era costituita da due soluzioni: metanolo (soluzione A) e sodio acetato [(40 mM), pH 3.5, soluzione B]. Il programma di eluizione prevedeva 12' in gradiente da 25 a 45% di soluzione A, 6' in gradiente da 45 a 100% di soluzione A, 5' da 100% soluzione A al 75% di soluzione B, e, infine, 10' in gradiente a 75% di soluzione B. Durante la fase di separazione, il flusso delle soluzioni era mantenuto a 1  $\text{ml min}^{-1}$ . La quantificazione di SA è stata effettuata in base a rette di calibrazione costruite per lo *standard* utilizzato.

Per l'isolamento e la quantificazione dell'acido jasmonico (JA) sono stati utilizzati 0,2 g di materiale macinato in mortaio con  $\text{N}_2$  liquido. La polvere così ottenuta è stata posta in una provetta da centrifuga con l'aggiunta di 3 ml di metanolo. I campioni sono stati agitati energicamente e conservati al buio a 4 °C per 18 ore. Il surnatante ottenuto dopo centrifugazione è stato filtrato mediante un filtro satellite da 0,2  $\mu\text{m}$  in PVDF, evaporato a

secco sotto vuoto a temperatura ambiente. Il residuo secco è stato quindi risospeso in una miscela di H<sub>2</sub>O e acido acetico allo 0,2% e nuovamente filtrato prima dell'iniezione. Il protocollo di corsa utilizzato è quello pubblicato da Kramell *et al.* (1999) e la quantificazione è stata effettuata mediante confronto con la curva di calibrazione ottenuta da soluzioni *standard* di JA nell'intervallo di concentrazione da 0,50 a 25 µg µl<sup>-1</sup>.

## 2.12. Determinazione della produzione di etilene e acido abscissico

La quantità di ET e acido abscissico (ABA) è stata valutata su foglie di melissa durante e dopo l'esposizione al singolo episodio puntiforme, in collaborazione con l'ex Dipartimento di Biologia delle Pianta Agrarie dell'Università di Pisa (ora Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali).

Nel primo caso è stato utilizzato il protocollo messo a punto da Mensuali-Sodi *et al.* (1992). Il materiale vegetale (circa 0,3 g) è stato posto in contenitori di vetro da 30 ml aventi un tappo a vite forato e dotato di setto di caucciù. Questi sono stati chiusi ermeticamente e la produzione dell'ormone è stata valutata a distanza di 1 ora (tempo necessario ad accumulare all'interno delle *vial* una quantità determinabile di etilene) a temperatura ambiente, prelevando un campione di aria di circa 2,5 ml mediante l'ausilio di una siringa ipodermica. La determinazione di ET prodotto è stata effettuata mediante gas-cromatografo (Hewlett e Packard, mod. 5890A, USA), utilizzando un *detector* FID (*Flame Ionization Detector*) e una colonna metallica (150 x 0,4 cm di diametro impaccata con Hysep T). La temperatura della colonna e del *detector* erano rispettivamente di 70 e 350 °C. Per la quantificazione dell'ormone prodotto, concentrazioni note (1000 ppm) di uno *standard* di etilene sono state iniettate all'inizio di ogni analisi. Come gas di trasporto è stato utilizzato N<sub>2</sub> a 40 ml min<sup>-1</sup>.

Il contenuto di ABA è stato valutato mediante *immunoassay* (ELISA) indiretto, basato sull'utilizzo dell'anticorpo monoclonale DBPA1 per S(+)-ABA (Vernieri *et al.*, 1989; Trivellini *et al.*, 2011). L'ELISA *test* è stato effettuato secondo il metodo descritto da Walker-Simmons (1987), con piccole modifiche. Il materiale vegetale (0,1 g) è stato raccolto, pesato e congelato in N<sub>2</sub>, poi conservato a -80 °C fino al momento dell'analisi. L'ABA è stato misurato dopo l'estrazione in H<sub>2</sub>O distillata (rapporto H<sub>2</sub>O:tessuto 10:1, v/w) per tutta la notte a 4 °C. Le piastre sono state sensibilizzate con 200 µl per pozzetto di ABA-4'-BSA, incubate per tutta la notte a 4 °C e, quindi, lavate tre volte con tampone fosfato salino (PBS), 75 mM, pH 7,0, contenente 1 g l<sup>-1</sup> di BSA e 1 ml l<sup>-1</sup> Tween 20, mantenendo la terza soluzione di lavaggio per 30' a 37 °C. Successivamente, sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 100 µl di

soluzione *standard* di ABA o del campione, quindi 100  $\mu\text{l}$  di soluzione DBPA1 (terreno di coltura cellulare liofilizzato diluito in tampone PBS contenente 10  $\text{g l}^{-1}$  BSA e 0,5  $\text{ml l}^{-1}$  Tween 20, ad una concentrazione finale di anticorpo pari a 50  $\text{mg ml}^{-1}$ ), lasciando avvenire la competizione per 30' ad una temperatura di 37 °C. Le piastre sono state lavate come descritto precedentemente; sono stati, poi, aggiunti 200  $\mu\text{l}$  per pozzetto del secondo anticorpo (anti-topo coniugato con fosfatasi alcalina, Sigma, in PBS + 10  $\text{g l}^{-1}$  BSA, alla diluizione finale di 1:2000) e incubato per 30' a 37 °C. Le piastre sono state nuovamente lavate e vi sono stati aggiunti 200  $\mu\text{l}$ , per pozzetto, di *p*-Nitrofenile per 30' a 37 °C. Le letture di assorbanza sono state effettuate a 415 nm, utilizzando un lettore di micropiastre (MDL 680, Perkin Elmer, USA).

### **2.13. Determinazione della quantità di acido ascorbico e di glutazione**

La quantità di acido ascorbico totale e della sua forma ridotta (AsA) è stata determinata è stata effettuata su materiale campionato durante e dopo il singolo episodio puntiforme, secondo il metodo descritto da Wang *et al.* (1991), basato sulla riduzione dello ione ferrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) in presenza di acido ascorbico in soluzione acida e conseguente formazione del chelato di colore rosso tra lo ione ferroso e la 4,7-difenil-1,10-batofenantrolina, che mostra un picco di assorbimento alla lunghezza d'onda di 534 nm. Il materiale vegetale (circa 0,5 g) è stato macinato in mortaio precedentemente raffreddato con  $\text{N}_2$  liquido. Per l'estrazione sono stati utilizzati 6 ml di una soluzione di TCA 5% (w/v). L'estratto è stato, poi, centrifugato a 12000 g per 10' a 4 °C. Il surnatante è stato filtrato (filtro a satellite da 0,2  $\mu\text{m}$  in PVDF). Per la determinazione dell'AsA, 100  $\mu\text{l}$  di estratto sono stati aggiunti a 650  $\mu\text{l}$  di etanolo e, per il contenuto totale (AsA + DHA), ad altri 100  $\mu\text{l}$  di surnatante sono stati aggiunti 150  $\mu\text{l}$  di DTT 3,89 mM, 350  $\mu\text{l}$  di etanolo e, dopo agitazione e incubazione per 10' a temperatura ambiente, 150  $\mu\text{l}$  di N-etilmaleimide 0,24% (in etanolo 96%). Infine, ai campioni sono stati aggiunti 150  $\mu\text{l}$  di TCA 20% (w/v), 150  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,4% (in etanolo 96%), 300  $\mu\text{l}$  di 4,7-difenil-1,10-batofenantrolina 0,5% (in etanolo 96%) e 150  $\mu\text{l}$  di  $\text{FeCl}_3$  0,03% (in etanolo 96%). Per il bianco sono stati utilizzati 100  $\mu\text{l}$  di TCA 5% (w/v) al posto dell'estratto. La reazione colorimetrica è stata lasciata sviluppare a 30 °C per 90' in agitatore termostato, al termine dei quali è stata registrata l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 534 nm. La quantificazione è stata effettuata costruendo una curva di calibrazione per AsA e AsA + DHA a partire da concentrazioni note di acido ascorbico (nel *range* tra 0-25 nmol). La quantificazione della forma ossidata (DHA) è stata ottenuta per differenza tra il contenuto totale e la forma ridotta.

Per la determinazione del contenuto totale di glutatione e della sua forma ossidata (GSSG) è stato seguito il protocollo di Anderson *et al.* (1997), basato sul saggio enzimatico del ciclo GSSG-acido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB). Tessuto vegetale (0,13 g) è stato macinato con N<sub>2</sub> liquido in mortaio precedentemente raffreddato. Ad esso sono stati aggiunti 2 ml di TCA 5% (w/v). Al fine di definire il contenuto totale di glutatione (GSSG + GSH), l'estratto vegetale acido (25 µl) è stato diluito mediante l'aggiunta di NADPH ed una miscela di due reagenti costituiti da: reagente 1 (Na<sub>2</sub>EDTA 15 mM, DTNB 0,3 mM e BSA 0,04%) e 2 (Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, BSA 0,02% e 12 µl glutatione riduttasi) immediatamente prima di innescare la cinetica di reazione, andando così a registrare spettrofotometricamente la velocità iniziale di formazione dell'acido 5,5-tiobis-2-nitrobenzoico (TNB) alla lunghezza d'onda di 412 nm. Il GSSG è stato determinato dopo rimozione del GSH dal campione, aggiungendo 20 µl di 4-vinilpiridina e 80 µl di trietanolammina 50% (v/v) a 1 ml di estratto vegetale. L'addizione di trietanolammina ha permesso di ottenere valori di pH compresi tra 5,5 e 7,5, condizione necessaria affinché avvenga una completa derivatizzazione del GSH presente. La quantificazione è stata eseguita dopo 1 ora di incubazione a temperatura ambiente, secondo le modalità già descritte per il GSH + GSSG. La quantità totale è stata determinata ricorrendo ad una curva di calibrazione costruita correlando la velocità di formazione del TNB con concentrazioni note di GSH, mentre per GSSG è stata costruita in maniera analoga a quanto precedentemente riportato una retta di calibrazione con dosi conosciute di GSSG.

#### **2.14. Determinazione dell'attività specifica dell'enzima fenilalanina ammonio-liasi**

Il materiale vegetale (0,3 g) derivante da esposizione cronica e campionato con cadenza settimanale per tutti i 35 giorni di trattamento, è stato conservato a -80 °C e macinato in mortaio, precedentemente raffreddato con N<sub>2</sub> liquido. Alla polvere così ottenuta sono stati aggiunti 3 ml di soluzione tampone contenente borato di potassio 100 mM (pH 8,8), con 2-β-mercaptoetanolo 14 mM. L'omogenato è stato posto in centrifuga a 13000 g per 30'. Il surnatante è stato utilizzato per la determinazione dell'attività specifica della PAL. La miscela di reazione prevedeva l'unione di 100 µl di estratto, 1 ml di tampone borato 100 mM (pH 8,8) e 200 µl di 100 mM L-fenilalanina, al fine di riprodurre la reazione di deaminazione catalizzata dalla PAL che, partendo dalla L-fenilalanina, arriva alla formazione di acido *trans*-cinnamico ed NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. I bianchi sono stati preparati sostituendo 200 µl di 100 mM L-fenilalanina con 200 µl di tampone borato 100 mM. Per la determinazione dell'attività enzimatica, la miscela è stata posta ad incubare per 2 ore a 37 °C e, al termine

dell'incubazione, la reazione è stata arrestata mediante l'aggiunta di 50  $\mu$ l di HCl 5 N (modificato da Ke e Saltveit, 1986). La lettura di assorbanza è stata effettuata allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 290 nm, che corrisponde al picco massimo di assorbimento dell'acido *trans*-cinnamico. Il coefficiente di estinzione molare dell'acido *trans*-cinnamico è pari a 9500 mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Cheng e Breen, 1991).

La determinazione del contenuto proteico è stata effettuata secondo il protocollo descritto da Bradford (1976), utilizzando il *Protein Assay kit II* (BIORAD), come precedentemente descritto (cfr. par. 2.10).

### **2.15. Determinazione degli acidi fenolici e flavonoidi**

L'estrazione degli acidi fenolici e dei flavonoidi è stata effettuata su foglie prelevate da individui sottoposti a trattamento cronico e campionate a 7, 14, 21, 28 e 35 giorni dall'inizio del trattamento e conservate a -80 °C fino al momento dell'analisi, secondo il metodo di Sgarbi *et al.* (2003), apportando opportune modifiche.

Frazioni di campione di 0,03 g sono stati posti in 3 ml di una soluzione contenente metanolo puro (per HPLC), H<sub>2</sub>O e acido cloridrico in rapporto 84:15:1 e posti in agitatore termostato per 24 ore; l'estratto è stato, poi, filtrato mediante un filtro satellite da 0,2  $\mu$ m in PVDF. Il contenuto degli acidi fenolici e dei flavonoidi è stato determinato mediante HPLC, registrando i picchi in uscita a  $\lambda$  = 280 nm.

La separazione è stata condotta utilizzando una colonna Dionex (Acclaim 120, C18), la cui fase mobile è costituita da due soluzioni, una miscela di H<sub>2</sub>O /acido acetico 99:1, v/v (soluzione A) ed una di metanolo/aceto nitrile/acido acetico 94:5:1 v/v (soluzione B). Il programma di eluizione ha previsto: 2' in gradiente dal 100% di soluzione A al 5% di soluzione B; 8' in gradiente fino al 25% di soluzione B; 10' in gradiente fino al 45% di B; 10' in gradiente fino al 50% di B; 20' in gradiente fino al 100% di B; 5' in isocratica al 100% di soluzione B; 15' in gradiente dal 100% al 5% di B. Durante tutta la fase di separazione il flusso delle soluzioni è stato mantenuto a 1,5 ml min<sup>-1</sup> e la temperatura della colonna a 30 °C, secondo il protocollo di Zhou *et al.* (2004). Il riconoscimento dei composti di interesse è stato effettuato in corrispondenza dei picchi di massimo assorbimento, per confronto dei tempi di ritenzione e degli spettri UV con gli *standard* relativi.

## **2.16. Valutazione dell'espressione genica degli enzimi della via dell'acido rosmarinico**

Le analisi sono state condotte su piante trattate e di controllo a 0, 7, 14 e 35 giorni successivi all'inizio della fumigazione. Questo lavoro è stato svolto in collaborazione con la Prof.ssa Petersen della facoltà di Biologia Farmaceutica e Biotecnologie della Philipps-Universität di Marburg, Germania.

### **2.16.1. Isolamento e quantificazione dell'RNA totale**

L'RNA totale è stato isolato da foglie conservate a -80 °C fino al momento dell'utilizzo. Il protocollo di estrazione utilizzato è stato quello messo a punto da Giuliano *et al.* (1993) con opportune modifiche. Campioni fogliari di 0,3 g sono stati macinati in N<sub>2</sub> liquido e posti in una *vial* contenente 500 µl di *buffer* di estrazione [guanidina tiocianato 4M, Na-acetato 100 mM, N-laurilsarcosina 1%, pH 5,2], 3,5 µl β-mercaptoetanolo, 400 µl fenolo (saturato con tampone citrato). Sono stati aggiunti 100 µl di cloroformio con successiva incubazione in ghiaccio per 20' e centrifugazione per 30' a 16000 g a 4 °C. Il surnatante è stato quindi trasferito in una nuova *vial* con l'aggiunta di pari volume di isopropanolo e successiva incubazione in ghiaccio per 40'. A questo punto il surnatante è stato completamente rimosso e il precipitato è stato posto ad asciugare a 37 °C per qualche minuto. Il *pellet* è stato sciolto in 500 µl di TE *buffer* [Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0] mediante incubazione in ghiaccio per circa 60'. Sono stati successivamente aggiunti 100 µl di etanolo (96%) e lasciati in ghiaccio per 20'; questo passaggio è necessario per la precipitazione dei polisaccaridi. Dopo centrifugazione (10000 g per 10' a 4 °C) al surnatante sono stati aggiunti 200 µl di cloruro di litio (LiCl) 8 M per la precipitazione dell'RNA in ghiaccio per almeno 90'. In seguito a centrifugazione (16000 g per 20' a 4 °C) è stato rimosso il surnatante e il *pellet* è stato lavato con etanolo all'80% e lasciato asciugare a 37 °C. Quest'ultimo è stato quindi disciolto in 20 µl di H<sub>2</sub>O sterile e la quantificazione è stata effettuata misurando l'assorbanza a 280 e 260 nm mediante biofotometro plus (Eppendorf) in cuvette monouso UVette®. Il controllo della qualità dell'RNA estratto è stato effettuato mediante elettroforesi su gel di agarosio allo 0,7% (w/v) in TBE buffer allo 0,5% (Tris 0,45 M, acido borico 0,45 M, EDTA 15 mM).

### **2.16.2. Sintesi del DNA complementare (cDNA)**

Con l'aiuto del *RevertAid® First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas) la stessa concentrazione di RNA (1 µg) per ogni campione è stata retro-trascritta in cDNA, secondo il

protocollo del fornitore. Al template è stato aggiunto 1 µl di *primer* oligo (dT) e H<sub>2</sub>O *nuclease-free*. Dopo aver incubato per 5' a 65 °C, il campione è stato raffreddato in ghiaccio e sono stati aggiunti nell'ordine: 4 ml di *Reaction Buffer* 5x, 1µl di *RiboLock* inibitore delle RNasi (20 u/µl), 2 µl di dNTP mix 10 mM e 1 ml di trascrittasi inversa Revertaid M-MuLV (200 u/µl), per un volume finale di 20 µl. A questo punto la *vial* è stata incubata a 65 °C per 60' e per terminare la reazione il tutto è stato posto a 70 °C per 5'. I campioni che non hanno avuto un utilizzo immediato sono stati conservati a -20 °C.

### 2.16.3. Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Il cDNA così ottenuto è stato utilizzato come template per la reazione di PCR con i *primer* specifici per diversi geni coinvolti nella biosintesi dell'acido rosmarinico (RA). L'amplificazione è stata eseguita partendo da 0,5 µl cDNA (equivalenti a 0,025 µg di RNA) e da coppie di *primer* specifici per il gene dell'Actina (313 bp) utilizzato come gene di controllo e per i geni codificanti gli enzimi. Di seguito sono riportate le coppie di *primer* utilizzate per l'espressione di ciascun gene:

✓ Actin-primer

Lam-Actin-f GGA TGA TAT GGA GAA GAT (T/A)TG TGG C

Lam-Actin-r AGA TCA CGM CCA GC(A/T) AGA TC

✓ RAS (Berger *et al.* 2006; Weitzel e Petersen 2011),

Mo RAS-VL5 ATG AGG ATC GAT ATC AAG GAC

Mo RAS-VL3 TCA AAT CTC ATA AAA CAA CTT CTC AA

✓ PAL (Weitzel e Petersen, 2010)

Mo PAL-VL5 ATA CAT ATG GCA GAG AAC GGT CAT CAT GAT TCC

Mo PAL-VL3 ATA CAT ATG CTA GCA GAT AGG CAG AGG TCC ACC ATT

✓ 4CL (Weitzel e Petersen, 2010)

4CL-for ATG GAG AAC CCG GCA GGC CAA G

4CL-rev TTA GAC TGC AGC TGC TAA TCT TGA TCT

Tutti i primer sono stati sintetizzati esternamente dalla ditta Eurofins MWG-Operon (Ebersberg, Germania).





### **2.17. Biomassa e area fogliare**

Al termine dell'esposizione cronica, 13 piante trattate e 13 di controllo sono state selezionate in maniera casuale e ne è stata misurata l'altezza totale. Successivamente, sono state separate le foglie, al fine di valutarne il numero per ogni tesi e l'area specifica (*Specific Leaf Area* SLA), mediante l'utilizzo di un *Leaf Area Meter* con trasportatore a nastro (Li-COR 3050A, USA) (Sebastiani *et al.*, 2004). È stato calcolato il peso fresco (PF) e secco (PS) di foglie, fusti e radici separatamente, accuratamente lavati con H<sub>2</sub>O distillata per rimuovere eventuali residui di terreno. Successivamente, è stato calcolato il rapporto *Root:Shoot* in accordo con quanto riportato da Roger *et al.* (1996).

### **2.18. Estrazione dell'olio essenziale**

L'olio essenziale è stato estratto a partire da prodotto fresco proveniente da materiale esposto a trattamento cronico. Questo ha consentito di ottenere un olio ricco nei suoi componenti e non privato della frazione maggiormente volatile. È stato utilizzato un distillatore di tipo *clevenger* (Tecnovetro, Monza, Italia) con una capienza del bollitore di 2 l. Le foglie utilizzate per ogni distillazione sono state precedentemente pesate (100 g circa), in modo da poter calcolare la resa media. Nello specifico, per ogni distillazione è stato necessario posizionare il distillatore sul bollitore e riempire la caldaia con un litro d'H<sub>2</sub>O.

Durante la distillazione il vapore generato dall'H<sub>2</sub>O in ebollizione, attraversa la massa vegetale arricchendosi delle molecole volatili contenute in essa, risale lungo la testata e passando nel condensatore, costantemente raffreddato, ritorna allo stato liquido fino a cadere nella buretta graduata in 2 fasi separate, l'olio essenziale e H<sub>2</sub>O distillata. Una volta terminata la distillazione, grazie al rubinetto posto alla fine della buretta, è possibile far fuoriuscire l'H<sub>2</sub>O ed in seguito l'olio essenziale. L'inizio della registrazione del tempo di distillazione è dettato dalla caduta della prima goccia nella buretta graduata, a una temperatura costante di circa 80 °C, fino al trascorrere delle 2 ore.

Dopo aver registrato i volumi di olio ottenuti, il campione è stato conservato in frigorifero a una temperatura di 4 °C in assenza di luce.

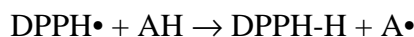
### **2.19. Determinazione della capacità antiossidante totale dell'estratto vegetale**

I saggi utilizzati per la determinazione della capacità antiossidante totale sono stati differenti, in base al tipo di campione analizzato. L'estratto ottenuto da foglie sottoposte a trattamento acuto sono state analizzate mediante saggio DPPH• (a 1, 2, 5, 8, 24 e 48 ore dall'inizio del

trattamento). Gli estratti metanolici derivanti dall'esposizione cronica, invece, sono stati analizzati a cadenza settimanale per i 35 giorni di trattamento, mediante saggi ORAC e HORAC. Gli stessi *test* sono stati utilizzati per valutare la capacità antiossidante dell'olio essenziale, estratto da foglie trattate e di controllo esclusivamente all'ultimo tempo di analisi.

### 2.19.1. Saggio DPPH•

Questo *test* (Bolis, 1958) consente di stimare la capacità di un estratto di agire come donatore di atomi di idrogeno o di elettroni nella reazione di riduzione del 2,2-difenil-1-picrilidrazile radicalico (DPPH•) in DPPH-H (Frankel e Meyer, 2000), secondo la reazione di seguito riportata:



Ad 1 ml di estratto in metanolo a concentrazioni crescenti (da 0,80 a 25 mg ml<sup>-1</sup>) è stato aggiunto 1 ml di DPPH• 0,2 mM. Dopo un periodo di incubazione di 30' a temperatura ambiente, sono state effettuate le letture delle assorbanze dei campioni e dell'AsA (utilizzato come controllo positivo) a 520 nm. La percentuale di inibizione del DPPH• (espressa come IC<sub>50</sub>: milligrammi di antiossidante necessari per ridurre del 50% il quantitativo di composto radicalico presente in 1 ml di soluzione) è stata calcolata come:

$$\text{IC}_{50} (\%) = 100 (\text{Abs}_{\text{bianco}} - \text{Abs}_{\text{campione}}) / \text{Abs}_{\text{bianco}}$$

### 2.19.2. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

Il saggio ORAC è un potente strumento necessario per la valutazione della capacità antiossidante di molecole biologiche. A questo scopo è stato utilizzato il kit *OxiSelect™ Activity Assay measures* (Cell Biolabs, San Diego, USA), seguendo il protocollo proposto dal fornitore.

In questo *kit* la fluoresceina è usata come sonda fluorescente, secondo il metodo descritto da Huang *et al.* (2002). L'analisi è stata condotta utilizzando una piastra con 96 pozzetti, in ognuno dei quali a 25 µl di estratto fogliare sono stati aggiunti 150 µl di sonda (8,16 x 10<sup>-5</sup> mM in 75 mM di tampone fosfato, pH 7,4) e incubati a 37 °C per 15'. Successivamente ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 25 µl di iniziatore radicalico [2,2'-Azobis (2-metilpropionamidine) idrocloride] (AAPH) 153 mM e agitato per 30''. La fluorescenza è stata registrata (λ<sub>eccitazione</sub> = 485 nm, λ<sub>emissione</sub> = 520 nm) ogni 75'' per 50' con uno spettrofluorimetro (Victor3 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer, USA). Tutti i

campioni sono stati analizzati a quattro diverse diluizioni e la media è stata utilizzata come valore ORAC (Huang *et al.*, 2002).

Il trolox (un analogo della vitamina E) è stato utilizzato come *standard* per la costruzione di una retta di calibrazione, con concentrazioni scalari da 0 a 50  $\mu\text{M}$ , preparato fresco in tampone fosfato.

L'attività antiossidante del campione è correlata alla curva che si ottiene dal decadimento della fluorescenza della sonda, che è generalmente rappresentata dall'area sottesa alla curva (AUC). I risultati sono stati quindi calcolati sulla base delle differenze ottenute con il calcolo dell'AUC tra il bianco, i campioni e lo *standard*. In questo modo è stato possibile quantificare l'attività antiossidante del campione contro i perossiradicali, confrontando l'andamento della curva ottenuta dal campione con quella ottenuta dall'attività antiossidante del trolox. Per tutte le determinazioni sono state svolte almeno tre ripetizioni.

### **2.19.3. Hydroxyl radical absorbance capacity (HORAC)**

Come il saggio precedente, anche l'HORAC rappresenta un potente mezzo per la misura della capacità antiossidante di molecole biologiche. In questo caso però il kit *OxiSelect™ HORAC Activity Assay* (Cell Biolabs, San Diego, USA), ha come bersaglio la capacità di detossificazione degli idrossiradicali liberi. Il protocollo utilizzato è stato quello proposto dal fornitore e messo a punto da Ou *et al.* (2002).

L'attività del saggio HORAC è basata sull'ossidazione di una sonda fluorescente da parte di idrossiradicali, mediante il processo basato sul trasferimento di un atomo di idrogeno (HAT). Questi radicali sono prodotti da un iniziatore radicalico e dal reagente di Fenton, presenti nel *kit*. Tali composti si legano alla sonda facendo cadere la fluorescenza in un tempo molto breve. Ma se nella miscela di reazione sono presenti molecole antiossidanti che agiscono bloccando l'ossidazione radicalica della sonda, la fluorescenza resta alta finché l'attività antiossidante dei composti saggiati non viene completamente esaurita. Il decadimento di tale parametro è misurato dalla AUC netta, che si ottiene confrontando l'andamento della curva ottenuta dal campione con quella ottenuta dall'attività antiossidante dell'acido gallico, usato come controllo positivo.

La fluorescenza è stata registrata ( $\lambda_{\text{eccitazione}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emissione}} = 530 \text{ nm}$ ) ogni 5' per 60', con uno spettrofluorimetro (Victor3 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer, USA). Tutti i campioni sono stati analizzati a quattro diverse diluizioni e la media è stata utilizzata come valore HORAC (Huang *et al.*, 2002).

## 2.20. Analisi statistica dei dati

Per quanto riguarda le sperimentazioni relativamente al trattamento acuto, dopo aver verificato l'omogeneità delle varianze mediante il *test* W di the Shapiro–Wilk, è stata effettuata l'analisi della varianza (ANOVA) a una via, considerando il tempo come fattore. Il confronto tra le medie è stato eseguito tramite il *test* di Bonferroni ( $P \leq 0,05$ ). Dal momento che i dati ottenuti dalle piante di controllo prima, durante e dopo il periodo di fumigazione non evidenziavano significative differenze per il suddetto confronto sono state considerate le piante di controllo misurate prima dell'inizio della fumigazione.

Per quanto riguarda invece l'esperimento di fumigazione cronica, l'analisi statistica dei dati è stata svolta mediante ANOVA a due vie, considerando i fattori “ozono” e “tempo di esposizione” e dove l'interazione è risultata significativa, le differenze statistiche tra le medie sono state determinate tramite il *test* della differenza minima significativa (LSD), a livello di significatività  $P \leq 0,05$ .

Infine, le differenze significative tra le medie delle piante di controllo e di quelle sottoposte a trattamento cronico con O<sub>3</sub>, ma analizzate ad un singolo tempo, sono state determinate con il *t-test di Student's*, più idonea per analizzare dati derivanti da una comparazione a coppie.

Sono stati utilizzati i *software* NCSS 2004 e Statistica 6.0. Per tutte le elaborazioni si è fatto riferimento al testo di Zar (1984).

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1. Episodio puntiforme

##### 3.1.1. Risultati episodio puntiforme

L'esposizione all' $O_3$  ha indotto la manifestazione di sintomi dopo circa 48 ore dal termine della fumigazione. Le foglie mostravano piccole (1-2 mm di diametro) aree necrotiche rotondeggianti di colore scuro nella zona internervale della pagina superiore (Figura 14A). La superficie danneggiata risultava circa il 15% del totale. Già dopo 24 ore dalla fine del trattamento è stato possibile evidenziare, mediante colorazione con Evans blu e DAB, rispettivamente gruppi di cellule morte e depositi di  $H_2O_2$  (Figura 14B, C).

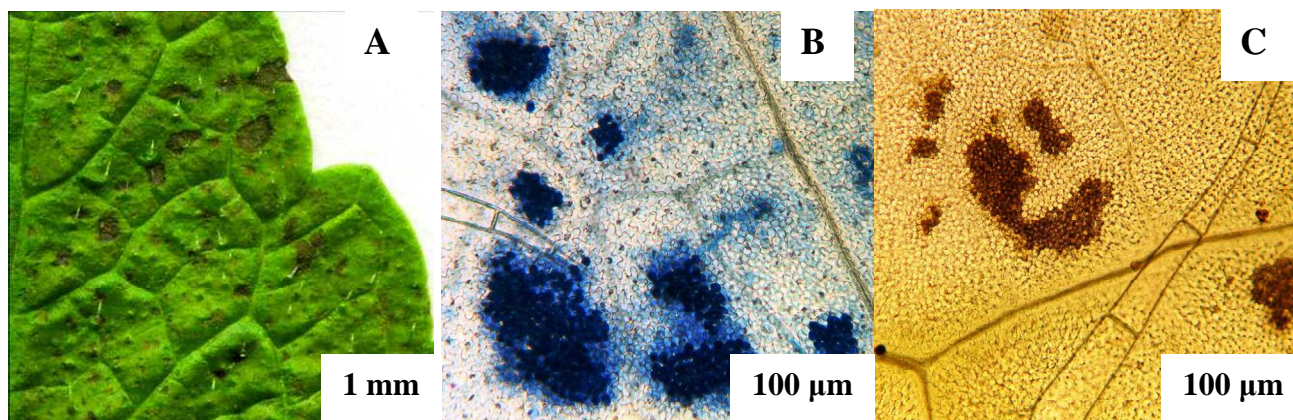


Figura 14 – Tessuto fogliare di piante di *Melissa officinalis* esposte a ozono (200 ppb, 5 ore): A) piccole necrosi rotondeggianti di colore scuro che si manifestano nella zona internervale della pagina superiore circa 48 ore dopo la fine della fumigazione; B) cellule morte del mesofillo, colorate con Evans blu 24 ore dopo il trattamento; C) depositi (di colore bruno) di acqua ossigenata nel mesofillo.

In Figura 15 sono riportati i dati relativi a  $H_2O_2$  (*in alto*) e  $O_2^-$  (*in basso*). Nelle prime ore di esposizione, è stato osservato un significativo incremento del contenuto in  $H_2O_2$  rispetto ai controlli mantenuti in aria filtrata (+68 e +59%, rispettivamente dopo 1 e 2 ore); al termine del trattamento i valori sono ritornati ai livelli del controllo. Nel *recovery*, si notava un secondo picco (+44% dopo 24 ore) e, poi, ancora una stabilizzazione alle condizioni iniziali. Modificazioni significative riguardavano anche  $O_2^-$ . Durante la fumigazione la sua concentrazione era significativamente inferiore rispetto a quella degli individui ozonati (-55% dopo la prima ora). Con la fine del trattamento, la sua concentrazione subiva un'ulteriore

riduzione (-63%); nel *recovery*, si verificava un marcato accumulo (ben 2 e 3 volte in più dei controlli, rispettivamente dopo 24 e 48 ore).

Il comportamento della SOD, enzima chiave che - essendo in grado di convertire  $O_2^-$  in  $H_2O_2$  - concorre alla rimozione delle ROS, è riportato in Figura 16.

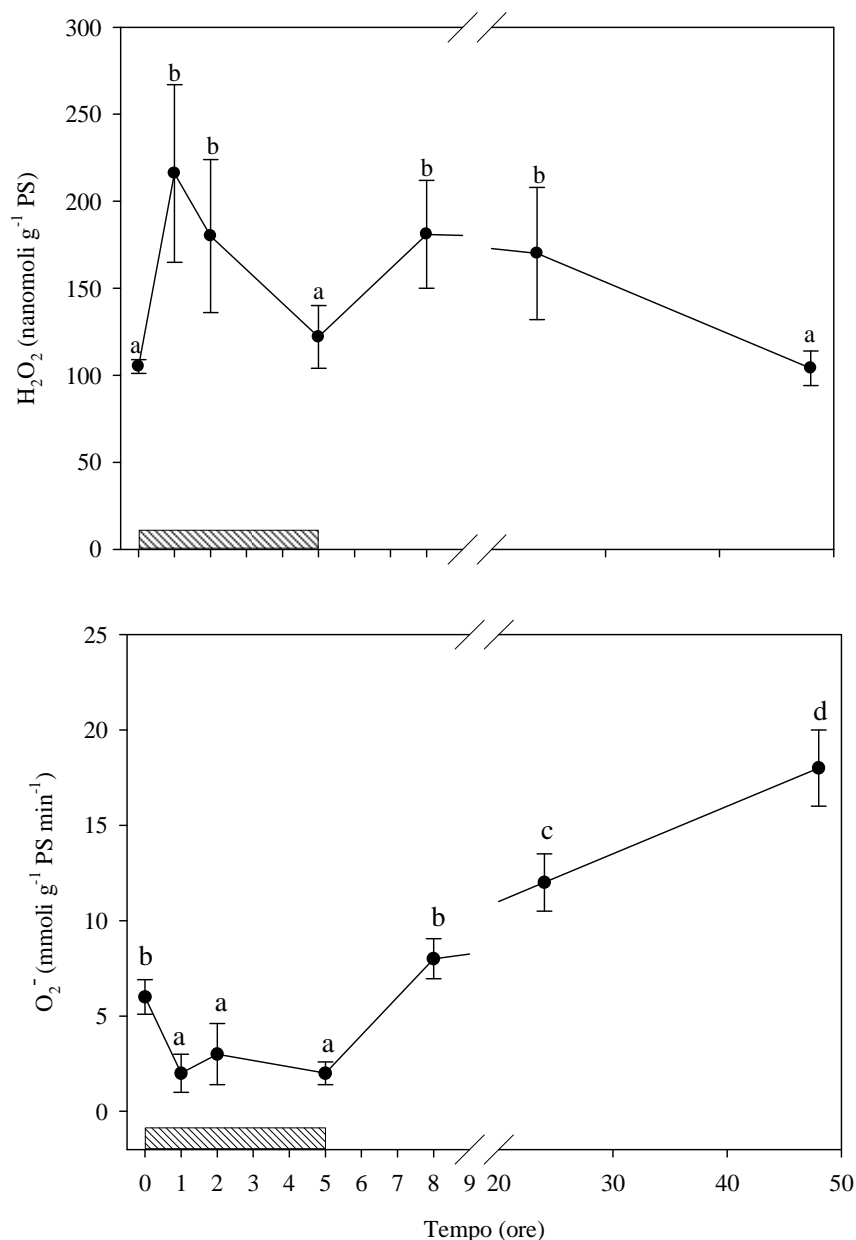


Figura 15 – Contenuto in acqua ossigenata (*in alto*) e in anione superossido (*in basso*) in piante di *Melissa officinalis* esposte a ozono (200 ppb, 5 ore). Le analisi si riferiscono a campioni prelevati dopo 1 e 2 ore dall'inizio del trattamento, alla fine di esso e nel periodo di *recovery* (8, 24 e 48 ore sempre dall'inizio del trattamento) oltre ai controlli mantenuti in aria filtrata (tempo 0). I valori riportati rappresentano la media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse corrispondono a valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ). Il box tratteggiato indica la durata del trattamento.

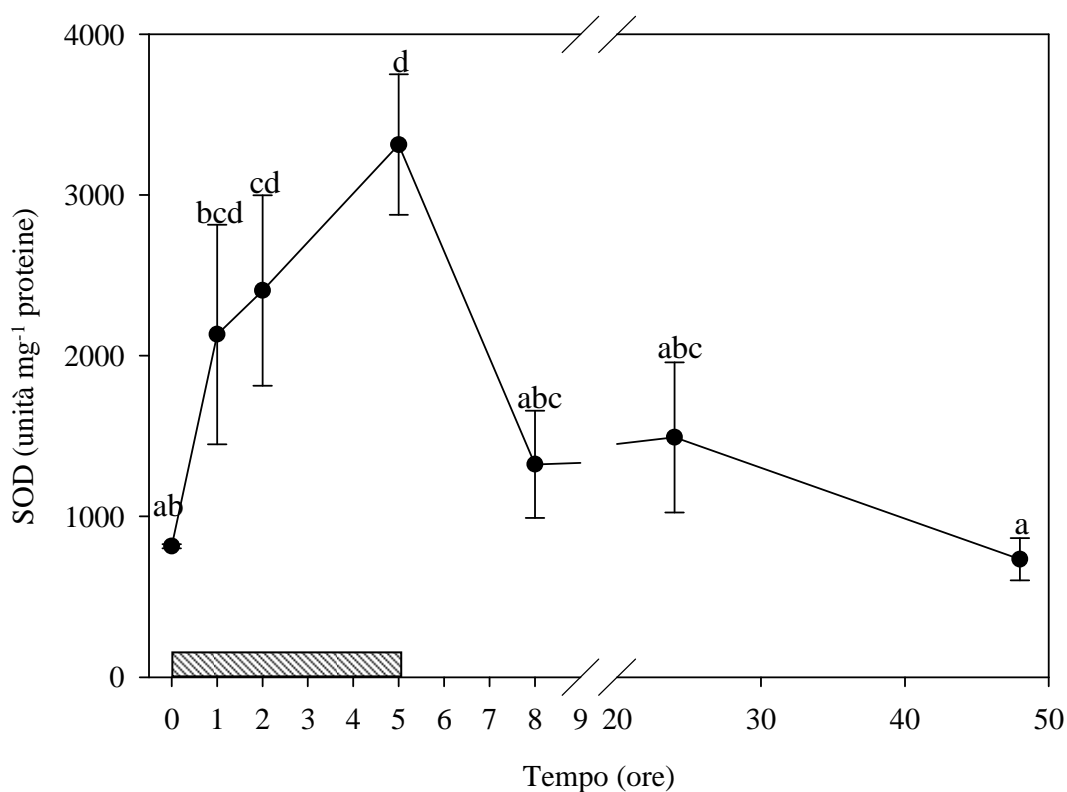


Figura 16 – Attività specifica della superossido dismutasi in piante di *Melissa officinalis* esposte a ozono (200 ppb, 5 ore). Le analisi si riferiscono a campioni prelevati dopo 1 e 2 ore dall'inizio del trattamento, alla fine di esso e nel periodo di *recovery* (8, 24 e 48 ore sempre dall'inizio del trattamento), oltre ai controlli mantenuti in aria filtrata (tempo 0). I valori riportati rappresentano la media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse corrispondono a valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ). Il box tratteggiato indica la durata del trattamento.

Già dopo 2 ore dall'inizio del trattamento, si assisteva ad una forte induzione dell'attività specifica di SOD (+196%), con il raggiungimento di un picco in corrispondenza della fine dell'esposizione, con valori ben tre volte superiori a quelli dei controlli mantenuti in aria filtrata. Durante il periodo di *recovery*, si vive un ritorno alla situazione iniziale.

In Figura 17 sono riportati i dati relativi al contenuto di acido ascorbico, nelle sue forme ridotta (AsA), ossidata (DHA), totale, oltre allo stato *redox* (AsA/AsA+DHA), da sempre considerato uno dei principali sistemi antiossidanti di natura non enzimatica in grado di mantenere lo stato di equilibrio tra la formazione e la rimozione di ROS. Dopo un'ora dall'inizio del trattamento, si osservava un marcato incremento in AsA (+57%), fino al raggiungimento di due picchi, il primo al termine della fumigazione e il secondo dopo 24 ore di *recovery*, in corrispondenza dei quali si notava un aumento di ben tre volte. I livelli di AsA continuavano a mantenersi elevati anche dopo 48 ore (+148%). Il contenuto in DHA era significativamente inferiore negli individui ozonati sin dalla prima ora di esposizione (-75%);

questo *trend* si manteneva fino al termine dell'esposizione (-82%) e durante il periodo di *recovery* (-52, -48 e -36% rispettivamente dopo 8, 24 e 48 ore). In generale, si è osservato un andamento in aumento di AsA+DHA (+20, +25, +56 e +34% dopo 5, 8, 24 e 48 ore), ad eccezione del valore riscontrato dopo un'ora dall'inizio della fumigazione (-25%). Per quanto concerne lo stato *redox*, si è registrato un notevole incremento già dopo un'ora dall'inizio del trattamento (ben 2 volte in più rispetto ai controlli); questo *trend* in crescita veniva mantenuto durante l'intero periodo di esposizione e il *recovery*.

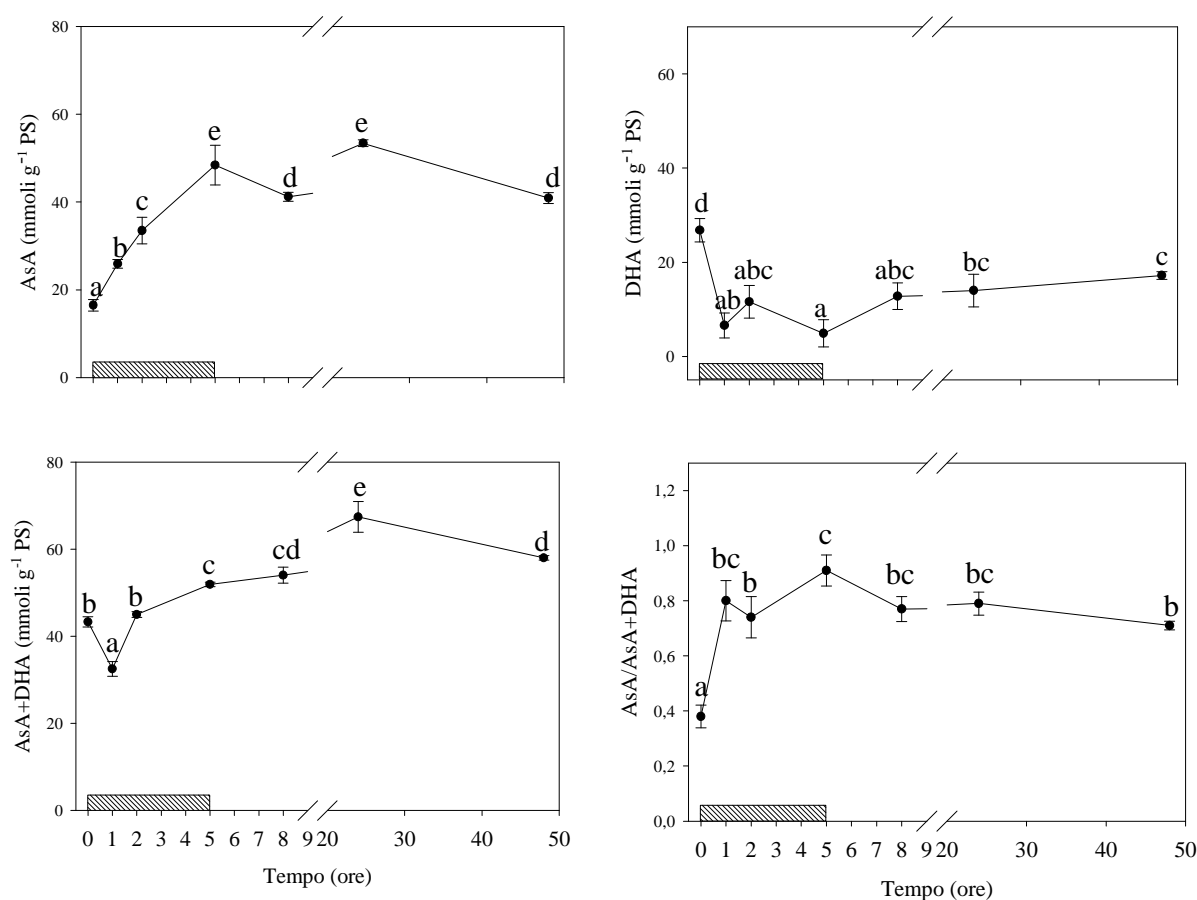


Figura 17 – Contenuto in acido ascorbico in forma ridotta (AsA, *in alto a sinistra*), ossidata (DHA, *in alto a destra*), totale (AsA+DHA, *in basso a sinistra*) e nel suo stato *redox* (AsA/AsA+DHA, *in basso a destra*) in piante di *Melissa officinalis* esposte a ozono (200 ppb, 5 ore). Le analisi si riferiscono a campioni prelevati dopo 1 e 2 ore dall'inizio del trattamento, alla fine di esso e nel periodo di *recovery* (8, 24 e 48 ore sempre dall'inizio del trattamento), oltre ai controlli mantenuti in aria filtrata (tempo 0). I valori riportati rappresentano la media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse corrispondono a valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ). Il box tratteggiato indica la durata del trattamento.

In Figura 18 sono riportati i dati relativi al contenuto in glutazione, nella forma ridotta (GSH), ossidata (GSSG) e come rapporto tra queste ultime (GSH/GSSG), che indica il



coinvolgimento di questa molecola nel meccanismo di trasduzione del segnale a livello intra- e intercellulare (essendo il GSH trasportato anche a lunga distanza).

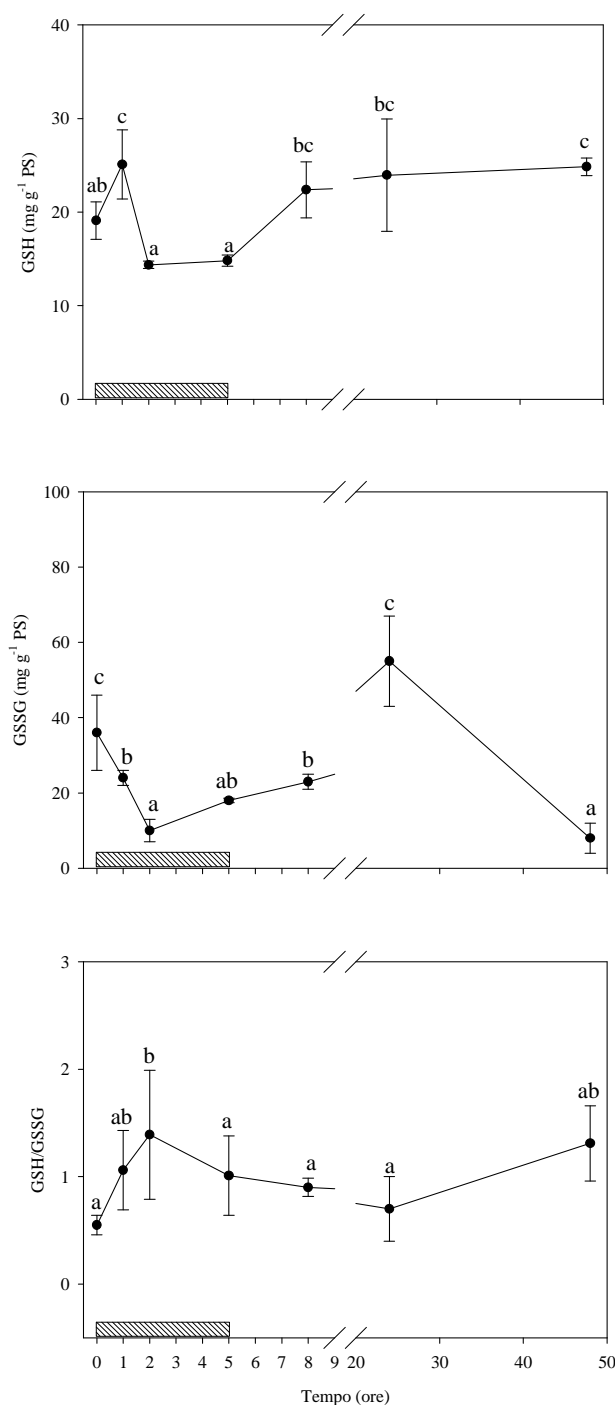


Figura 18 – Contenuto in glutazione in forma ridotta (GSH, *in alto*), ossidata (GSSG, *al centro*) e stato *redox* (GSH/GSSG, *in basso*) in piante di *Melissa officinalis* esposte a ozono (200 ppb, 5 ore). Le analisi si riferiscono a campioni prelevati dopo 1 e 2 ore dall'inizio del trattamento, alla fine di esso e nel periodo di *recovery* (8, 24 e 48 ore sempre dall'inizio del trattamento), oltre ai controlli mantenuti in aria filtrata (tempo 0). I valori riportati rappresentano la media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse corrispondono a valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ). Il box tratteggiato indica la durata del trattamento.

Dopo un'ora dall'inizio del trattamento, le piante hanno risposto allo *stress* ossidativo aumentando del 40% il contenuto di GSH. Nelle ore successive di esposizione, i livelli di questo metabolita non mostravano significative differenze rispetto al controllo. Durante il *recovery*, si è notato un incremento dopo 48 ore (+30% rispettivamente). I valori di GSSG si sono mantenuti significativamente inferiori negli individui ozonati sin dalla seconda ora di esposizione (-72%) e fino al termine (-70%); dopo 24 ore si osservava un ritorno ai livelli pre-fumigazione. Il GSH/GSSG ha mostrato un picco dopo due ore dall'inizio del trattamento (ben cinque volte in più rispetto ai controlli), per poi ristabilirsi alle condizione di partenza.

Il comportamento del  $\beta$ -carotene, che svolge una funzione di protezione del tessuto fogliare al livello del cloroplasto estinguendo l'ossigeno singoletto ( $^1\text{O}_2$ ), è evidenziato in Figura 19. Dopo un'ora dall'inizio del trattamento, si è riscontrata una marcata riduzione (-26%); nei restanti *step* del *time course*, l'andamento si è mantenuto costante sui livelli del controllo o leggermente inferiori (-15 e -16% rispettivamente dopo 8 e 24 ore).

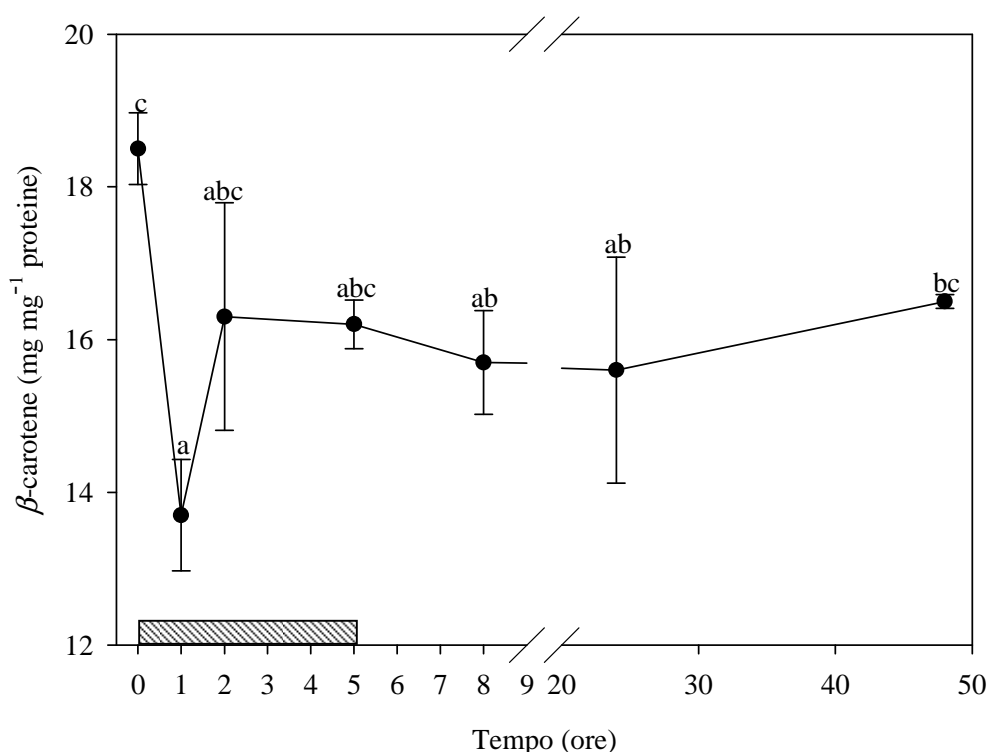


Figura 19 – Contenuto in  $\beta$ -carotene in piante di *Melissa officinalis* esposte a ozono (200 ppb, 5 ore). Le analisi si riferiscono a campioni prelevati dopo 1 e 2 ore dall'inizio del trattamento, alla fine di esso e nel periodo di *recovery* (8, 24 e 48 ore sempre dall'inizio del trattamento), oltre ai controlli mantenuti in aria filtrata (tempo 0). I valori riportati rappresentano la media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse corrispondono a valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ). Il box tratteggiato indica la durata del trattamento.

L'aggiunta di estratto di piante trattate e di controllo ad una soluzione a concentrazione nota di DPPH• attiva la reazione *redox*, provocandone il viraggio dal violetto al giallo (Molyneux, 2004). I valori, espressi come IC<sub>50</sub>, sono riportati in Figura 20. I livelli minimi (corrispondenti ad una maggiore attività antiossidante) sono stati registrati per l'AsA e per il controllo, con quantitativi rispettivamente di  $1,49 \pm 0,180$  e  $1,59 \pm 0,048$  mg ml<sup>-1</sup>. Dopo 2 ore dall'inizio dell'esposizione, i valori aumentavano (+49%) per poi assumere un andamento costante per il restante periodo di esperimento. La capacità di ridurre il DPPH• delle varie tesi diminuiva (e con essa il potere antiossidante) nel seguente ordine: AsA (= controllo = piante trattate dopo 1 ora) > piante ozonate (indipendentemente dal momento di campionamento).

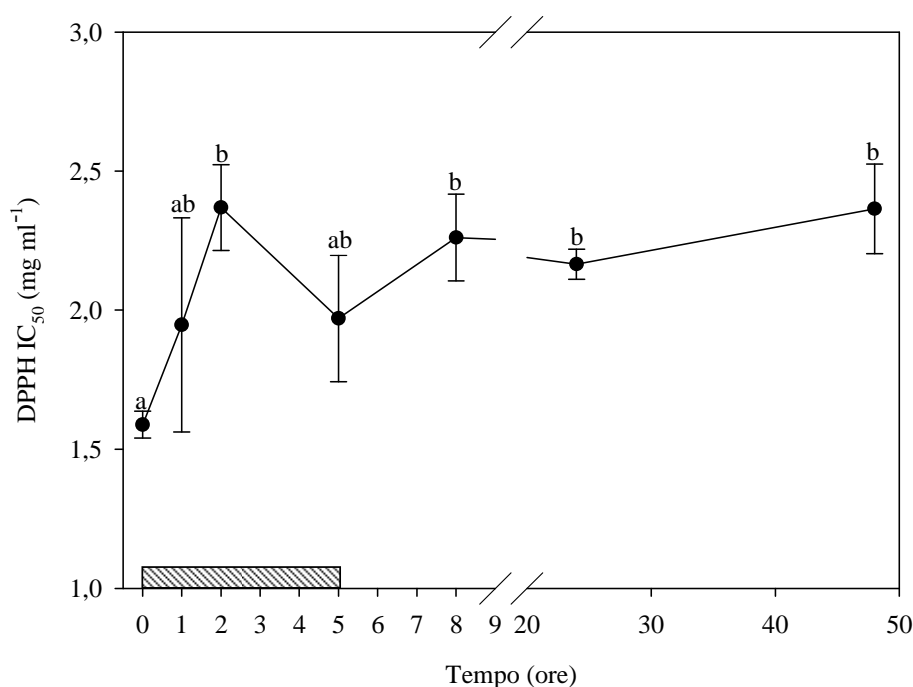


Figura 20 – IC<sub>50</sub> (inibizione del DPPH•, espressa milligrammi di antiossidante necessari per ridurre del 50% il quantitativo di composto radicalico presente in 1 ml di soluzione) in piante di *Melissa officinalis* esposte a ozono (200 ppb, 5 ore). Le analisi si riferiscono a campioni prelevati dopo 1 e 2 ore dall'inizio del trattamento, alla fine di esso e nel periodo di *recovery* (8, 24 e 48 ore sempre dall'inizio del trattamento), oltre ai controlli mantenuti in aria filtrata (tempo 0). I valori riportati rappresentano la media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse corrispondono a valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ). Il box tratteggiato indica la durata del trattamento.

In Figura 21 sono riportati i livelli di ABA e ET. La risposta di ABA è stata rilevata subito dopo un'ora dall'inizio del trattamento; si osservava, infatti, una riduzione significativa della sua concentrazione (-44 e -53%, rispettivamente dopo 1 e 2 ore di fumigazione).

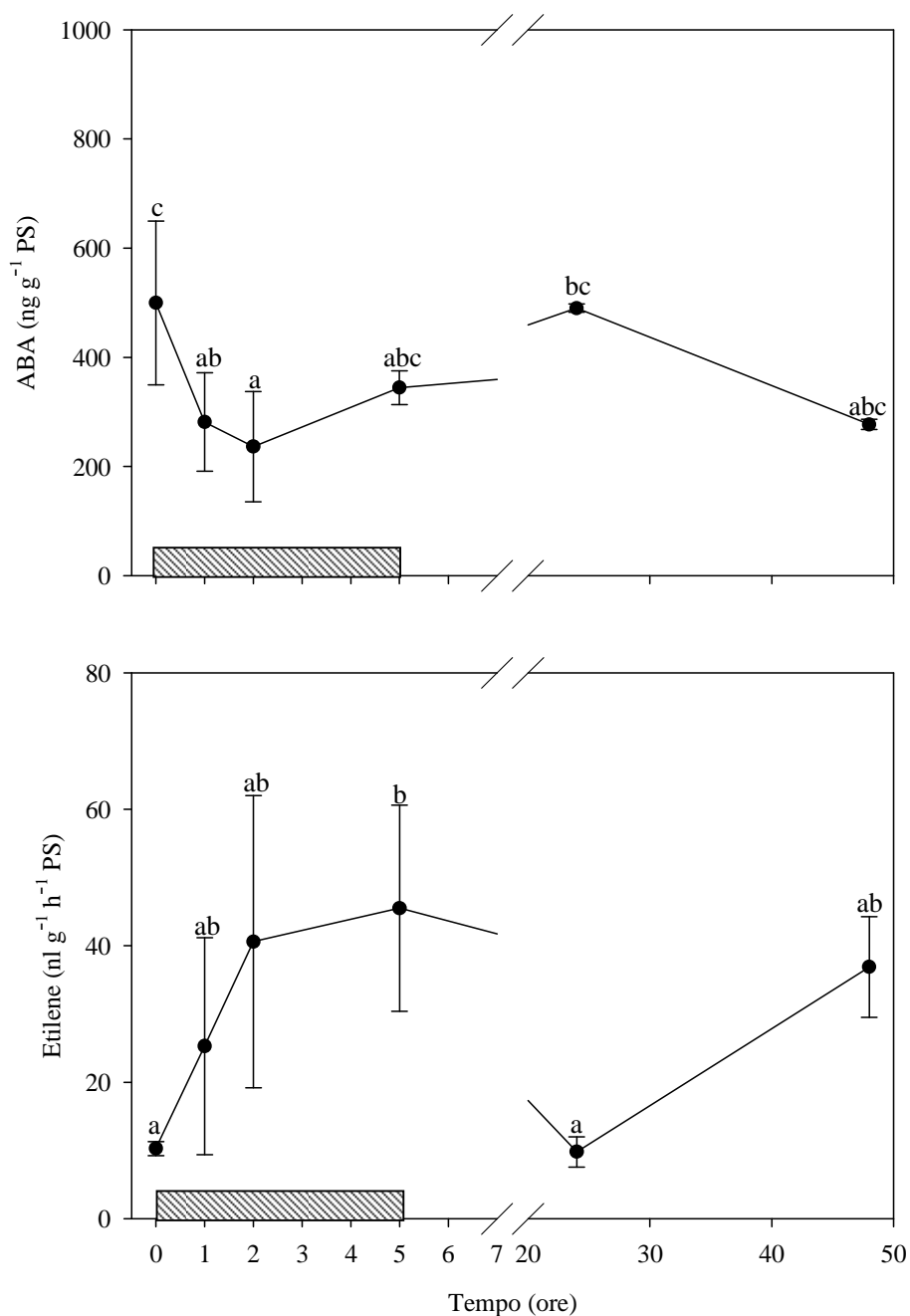


Figura 21 – Contenuto in acido abscissico (*in alto*) e in etilene (*in basso*) in piante di *Melissa officinalis* esposte a ozono (200 ppb, 5 ore). Le analisi si riferiscono a campioni prelevati dopo 1 e 2 ore dall'inizio del trattamento, alla fine di esso e nel periodo di *recovery* (24 e 48 ore sempre dall'inizio del trattamento), oltre ai controlli mantenuti in aria filtrata (tempo 0). I valori riportati rappresentano la media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse corrispondono a valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ). Il box tratteggiato indica la durata del trattamento.

Nelle ore successive, le piante ozonate sono riuscite a ripristinare i valori pre-fumigazione. La produzione di etilene è aumentata durante il trattamento per raggiungere un

picco alla fine di questo (cinque volte in più rispetto al controllo). Nel *recovery*, si aveva un ritorno ai livelli iniziali.

La fumigazione non ha influenzato in maniera statisticamente significativa il contenuto in SA (Figura 22), se non al termine del periodo di *recovery* (dopo 48 ore risultava due volte maggiore nelle piante fumigate rispetto a quelle di controllo). Per quanto concerne la produzione di JA (Figura 23) si registrava un picco nelle 8 ore successive dall'inizio del trattamento (dove la concentrazione di questo ormone era ben 1000 volte superiore rispetto ai controlli mantenuti in aria filtrata), tornando successivamente ai livelli costitutivi all'ultimo tempo di analisi.

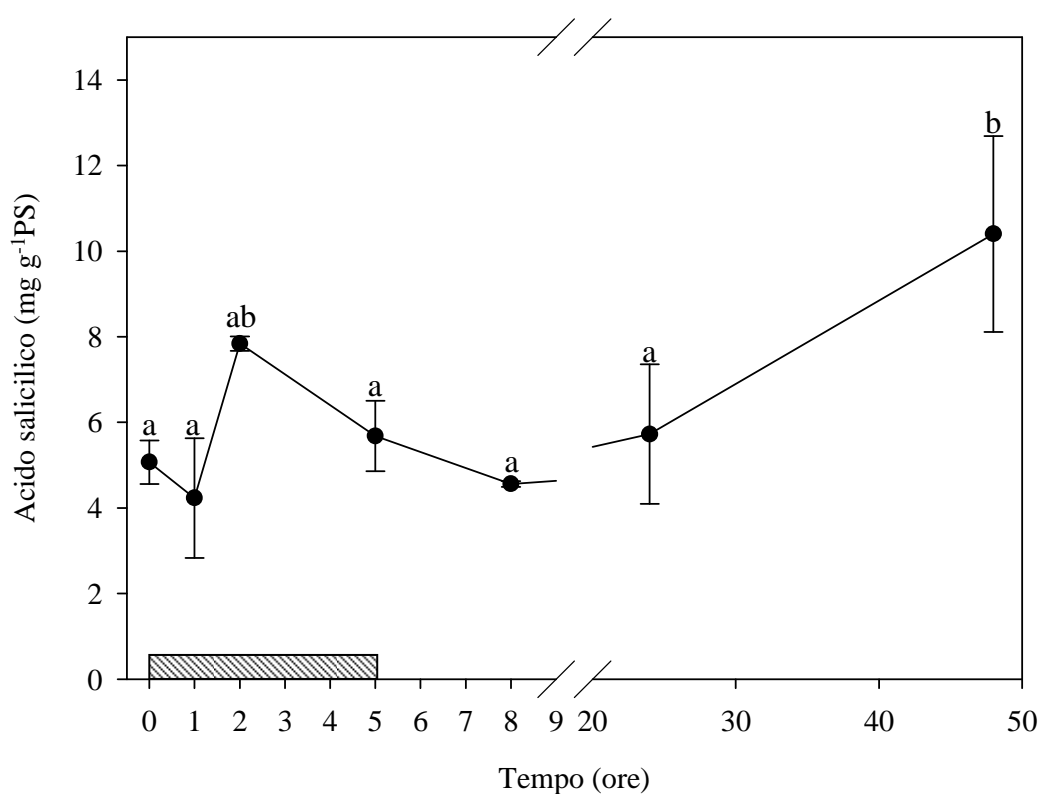


Figura 22 – Contenuto in acido salicilico in piante di *Melissa officinalis* esposte a ozono (200 ppb, 5 ore). Le analisi si riferiscono a campioni prelevati dopo 1 e 2 ore dall'inizio del trattamento, alla fine di esso e nel periodo di *recovery* (8, 24 e 48 ore sempre dall'inizio del trattamento), oltre ai controlli mantenuti in aria filtrata (tempo 0). I valori riportati rappresentano la media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse corrispondono a valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ). Il box tratteggiato indica la durata del trattamento.

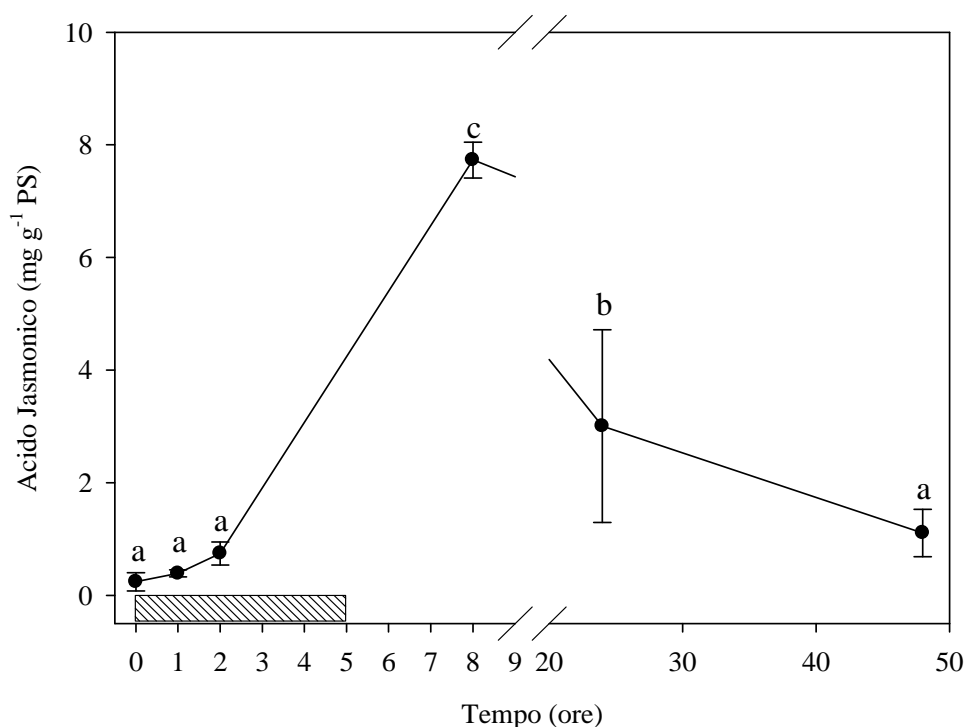


Figura 23 – Contenuto in acido jasmonico in piante di *Melissa officinalis* esposte a ozono (200 ppb, 5 ore). Le analisi si riferiscono a campioni prelevati dopo 1 e 2 ore dall'inizio del trattamento e nel periodo di *recovery* (8, 24 e 48 ore sempre dall'inizio del trattamento), oltre ai controlli mantenuti in aria filtrata (tempo 0). I valori riportati rappresentano la media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse corrispondono a valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ). Il box tratteggiato indica la durata del trattamento.

Le analisi svolte hanno riguardato alcuni indicatori sia biochimici (contenuto fogliare dei pigmenti fotosintetici e accessori) che fisiologici (mediante misure *in vivo* dell'attività fotosintetica e della fluorescenza della clorofilla *a*) coinvolti nel metabolismo primario della pianta.

Dall'analisi delle risposte ecofisiologiche, è possibile osservare che già al termine dell'esposizione all'O<sub>3</sub> si osservava una significativa riduzione del livello di fissazione di CO<sub>2</sub> e di conduttanza stomatica (-63% e -23%, rispettivamente), che potrebbe essere considerata la principale causa della caduta di A<sub>max</sub>, sebbene i livelli di concentrazione interna di CO<sub>2</sub> significativamente più elevati rispetto ai controlli (+41%), permettevano di supporre che la chiusura stomatica fosse una conseguenza dell'accumulo di CO<sub>2</sub> nella camera sottostomatica. Analizzando i parametri della fluorescenza della clorofilla *a*, si evidenziava che, già al termine dell'esposizione all'inquinante, si verificavano diminuzioni dell'efficienza del PSII, rappresentata dal rapporto  $F_v/F_0$  (-11,4% rispetto ai controlli), indicando che la sua

funzionalità e la sua abilità di ridurre l'accettore primario erano disturbate dal trattamento. Riduzioni significative dei valori di  $F_0$  e  $F_m$  per l'intero periodo di analisi confermavano l'esistenza di un'alterazione a livello dei sistemi antenna e dei centri di reazione. Per quanto riguarda i parametri biochimici presi in esame, è possibile osservare come il trattamento con  $O_3$  induceva un generale decremento del contenuto in pigmenti fotosintetici (-22% e -25% per clorofilla *a* e *b* rispetto ai controlli) ed accessori (-44% e -36% per quanto riguarda luteina e neoxantina rispetto alle piante mantenute in aria filtrata) che persisteva per l'intero periodo di analisi (Pellegrini *et al.* 2011a).

### 3.1.2. *Discussione episodio puntiforme*

Le somiglianze riscontrate tra i meccanismi attivati dall'O<sub>3</sub> e la HR osservata nell'interazione incompatibile pianta-patogeno hanno suggerito che questo inquinante possa comportarsi alla stregua di un elicitore fungino (Rao *et al.*, 2000). Di conseguenza, i suoi effetti si esplicherebbero attraverso una cascata di eventi regolati dall'induzione di molecole-segnale, che medierebbero la stimolazione di risposte secondarie a livello genico e metabolico.

Dopo 48 ore dalla fine della fumigazione, è possibile osservare la presenza di lesioni puntiformi localizzate per lo più nelle regioni internervali della pagina adassiale delle foglie completamente espanse. La comparsa di sintomi è da considerarsi la manifestazione macroscopica di una serie di eventi e modificazioni che si realizzano a livello cellulare e che si concludono con la morte della cellula stessa e che, ad oggi, non sono del tutto conosciuti (Rao *et al.*, 2000). Una volta penetrato all'interno della cavità sottostomatica, l'O<sub>3</sub> si decompone rapidamente nella fase acquosa della matrice apoplastica, dando origine alle ROS, il cui bersaglio primario è rappresentato dai lipidi e dalle proteine di membrana con conseguente (i) perdita della permeabilità selettiva, (ii) alterazione dell'integrità cellulare e (iii) possibile produzione di molecole-segnale. La sorte della cellula vegetale dipende, perciò, dal mantenimento o meno di un equilibrio tra generazione e detossificazione delle ROS mediante sistemi antiossidanti.

Nel corso dell'ultimo decennio numerose indagini hanno rivolto l'attenzione allo studio delle ROS prodotte in seguito a *stress* ossidativo e, in particolare, all'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, allo scopo di chiarirne il duplice ruolo di composto tossico e di intermedio nella trasduzione del segnale. Tali studi, rivolti soprattutto alla valutazione delle risposte ad esposizioni acute all'inquinante (Langebartels *et al.*, 2002; Iriti *et al.*, 2006), hanno evidenziato una correlazione tra i siti di accumulo dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e la formazione delle lesioni sulla superficie fogliare. Nel nostro caso, già dopo 24 ore dalla fine del trattamento, è possibile evidenziare gruppi di cellule morte (sebbene non fossero ancora visibili effetti macroscopici) e depositi di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Quanto riportato è in accordo con i risultati ottenuti da Iriti *et al.* (2006) in piante di tabacco cv. BelW3 esposte ad O<sub>3</sub> (50 ppb, 3 ore). *In vitro*, l'inquinante induce un precoce e transiente incremento del contenuto in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nelle prime due ore di trattamento; infatti, al termine dell'esposizione i livelli di questa molecola tornano ad essere analoghi a quelli costitutivi. Apparentemente, quanto affermato porterebbe a considerare questa specie come O<sub>3</sub>-resistente, in quanto la formazione precoce di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> risulta essere una risposta tipica di organismi scarsamente suscettibili al contaminante. L'approfondimento delle analisi alle 24 ore dalla fine della fumigazione ha permesso di comprendere maggiormente i meccanismi che queste piante attivano in conseguenza dello *stress*, in quanto il secondo picco di produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> può essere considerato il



preludio al fenomeno di PCD. Infatti, le fluttuazioni registrate durante l'intero periodo dell'esperimento, possono avere una funzione segnale per l'attivazione di una serie di processi (quali fosforilazione proteica, attivazione enzimatica, espressione genica, denaturazione delle membrane cellulari e appunto PCD) che mediano e definiscono la risposta della pianta, in accordo con quanto riportato da Di Baccio *et al.* (2008) in piante di pioppo sensibili all'O<sub>3</sub> esposte a trattamento cronico (60 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup>, per 15 giorni consecutivi). La stretta connessione tra la produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e la sensibilità dell'organismo all'O<sub>3</sub> risulta ad oggi, ampiamente testimoniata in studi condotti su numerose specie vegetali tra cui pomodoro (Wohlgemuth *et al.*, 2002; Di Baccio *et al.*, 2012), pioppo (Diara *et al.*, 2005), betulla (Pellinen *et al.*, 1999), tabacco (Kangasjärvi *et al.*, 2005), girasole (Ranieri *et al.*, 2003) e malva (Langebartels *et al.*, 2002).

In presenza di *stress* ossidativo, si verifica uno squilibrio tra la produzione e la degradazione delle ROS. Infatti, oltre ad osservare una maggiore produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, anche O<sub>2</sub><sup>-</sup>, da sempre considerato uno dei più importanti radicali in quanto precursore di altre forme reattive dell'O<sub>2</sub>, subisce cambiamenti evidenti. In particolare, gli individui trattati con O<sub>3</sub> mostrano un precoce e transiente calo del suo contenuto durante il periodo di esposizione, seguito da un significativo aumento, che si mantiene nelle ore di *recovery*, a conferma di una prolungata generazione di ROS, che sfocia nella comparsa di sintomi. Dal momento che i livelli di ROS soltanto al termine del trattamento sono tali da indurre il danno ossidativo, risulta di fondamentale importanza per il destino dell'organismo la presenza o meno di enzimi e metaboliti antiossidanti in grado di detossificare queste molecole. Per questo, è stata esaminata l'attività totale della SOD, che svolge un ruolo chiave nell'eliminazione dell'O<sub>2</sub><sup>-</sup> generato sia a seguito delle normali attività fisiologiche (quali fotosintesi e respirazione) sia in risposta a condizioni di *stress* ambientali. L'O<sub>3</sub> determina una rapida attivazione della SOD, che comporta un evidente calo nel contenuto di O<sub>2</sub><sup>-</sup>. L'induzione di questo enzima non è protratta nel tempo, tanto che si assiste ad un aumento della quantità del radicale dopo 48 ore dalla fine del trattamento. Tale considerazione dimostra che le piante ozonate non sono in grado di adattarsi all'inquinante, così da ridurre il successivo danno macroscopico. Quanto affermato è stato riscontrato anche per altre specie, come grano (Rao *et al.*, 1995) e *Ginkgo biloba* (He *et al.*, 2006). Comunque, gli studi sinora condotti sull'attività totale della SOD hanno portato a risultati che appaiono spesso contrastanti. In alcuni casi non sono state registrate significative variazioni a carico dei livelli di questo enzima (Sheng *et al.*, 1993; Kubo *et al.*, 1995; Wu e Tiendemann, 2002; Pina e Moraes, 2010); in altri è stata osservata una marcata stimolazione (Sharma e Davis, 1997; Elvira *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 1999; Nali *et al.*, 2004).

L'acido ascorbico svolge una funzione di protezione dal danno ossidativo indotto dall'O<sub>3</sub>, degradando i prodotti di questa molecola tramite reazioni (i) dirette (mediante la rigenerazione degli antiossidanti liposolubili come l' $\alpha$ -tocoferolo) e (ii) enzimatiche. La reattività della forma ridotta con il contaminante e l'entità del rifornimento di essa dal citoplasma all'apoplasto possono essere responsabili del differente grado di sensibilità mostrato da varie specie vegetali e/o *cultivar*, come dimostrato dalla maggiore suscettibilità a *stress* ossidativi di origine abiotica da parte di mutanti di *A. thaliana* caratterizzati da basse concentrazioni di tale molecola (Conklin *et al.*, 1997) e di piante transgeniche di tabacco caratterizzate da una sovraespressione dell'ascorbato perossidasi (Sanmartin *et al.*, 2003). Ad oggi, l'acido ascorbico è considerato la prima linea di difesa contro l'O<sub>3</sub> e le ROS da esso derivate. Nel nostro studio, già dopo un'ora dall'inizio del trattamento e per l'intero periodo di analisi, il contenuto in AsA subisce un significativo incremento, a dimostrazione di un'attiva risposta delle piante allo *stress* ossidativo allo scopo di mantenere uno stato di equilibrio tra la formazione di ROS e la loro rimozione. Quanto affermato è stato riscontrato anche per altre specie, come pioppo (Di Baccio *et al.*, 2008), girasole (Ranieri *et al.*, 2000), trifoglio (Scebba *et al.*, 2003b) e *Centaurea jacea* (Severino *et al.*, 2007). Il concomitante calo della forma ossidata e il generale aumento dello stato *redox* (che rappresenta la frazione di AsA rispetto al contenuto totale), osservato durante l'intero esperimento, suggeriscono che l'esposizione all'inquinante può indurre una marcata e precoce stimolazione degli enzimi del ciclo di Halliwell-Asada che, essendo in grado di rigenerare in maniera più rapida ed efficace l'AsA, ne determinano un accumulo. I nostri risultati sono in accordo con quanto riportato da Scebba *et al.* (2003a) in piante di *Trifolium pratense* esposte ad un trattamento acuto con O<sub>3</sub> (150 ppb, 3 ore).

Tra i vari percorsi di cui le piante dispongono per la rigenerazione della forma ridotta dell'ascorbato, vi è l'ossidazione del glutathione (nell'ambito del ciclo Halliwell-Asada). Questo composto tiolico, localizzato principalmente nel cloroplasto, occupa una posizione centrale all'interno dei sistemi di difesa, partecipando anche direttamente al processo di detossificazione delle ROS. Come osservato per il DHA, anche per la forma ossidata del glutathione si registra un calo di produzione dopo 2 e 5 ore dall'inizio del trattamento, a conferma del fatto che la marcata rigenerazione dell'AsA venga indotta dalla progressiva riduzione delle forme ossidate di queste due molecole antiossidanti. Poiché tale diminuzione risulta essere transiente nel tempo (visto che nei restanti tempi di analisi, i livelli di questo metabolita si ristabilizzano nelle condizioni iniziali) e contemporaneamente si registra un incremento della forma ridotta del glutathione rispettivamente dopo 1, 8 e 48 ore, sarà necessario lo studio della glutathione reductasi, al fine di comprendere al meglio se l'O<sub>3</sub> ne stimoli o meno l'attività e, soprattutto, il ruolo del glutathione nei meccanismi di

trasduzione del segnale. Quanto affermato è in accordo con i risultati ottenuti da Di Baccio *et al.* (2004) in piante di girasole sottoposte a *stress* salino.

Sono ben note le proprietà antiossidanti del  $\beta$ -carotene, che è in grado di annullare l'effetto dannoso dell' $^1\text{O}_2$  generatosi a seguito dell'interazione della clorofilla *a* con l' $\text{O}_2$  (Telfer *et al.*, 1994; Mikkelsen *et al.*, 1995). Il coinvolgimento di questo metabolita nei meccanismi di risposta all' $\text{O}_3$  è stato da tempo oggetto di numerosi studi (Antonielli *et al.*, 1997; Ranieri *et al.*, 2000, 2003; Pellegrini *et al.*, 2011b). Dall'analisi dei nostri risultati, è possibile osservare, dopo un'ora dall'inizio del trattamento, un significativo calo di questa molecola, che risulta però transiente, in quanto nei restanti *step* del *time course*, si ha un ritorno alla situazione iniziale. Quanto detto dimostra che la pianta risponde precocemente agli eventi fotossidativi indotti dal trattamento acuto (così come osservato mediante specifiche analisi in una precedente indagine, Pellegrini *et al.*, 2011a), riducendo il contenuto di  $\beta$ -carotene e tentando così di inibire i processi di perossidazione lipidica in atto.

L'incapacità delle molecole antiossidanti di ridurre l'effetto dannoso indotto dall'inquinante è confermata dal significativo incremento dei livelli di DPPH• osservato nelle piante fumigate già dopo due ore di esposizione. L'aumento di questo parametro è generalmente indicativo di una scarsa capacità del tessuto fogliare di combattere le ROS. I pochi studi sinora condotti sulla capacità antiossidante totale hanno portato a risultati che appaiono spesso contrastanti: in alcuni di questi lavori non sono state registrate significative variazioni a carico dei livelli di questo indice (Tzortzakis *et al.*, 2007; Alothman *et al.*, 2010) e in altri è stata osservata una marcata stimolazione (Alothman *et al.*, 2010).

I cambiamenti nel contenuto di acido ascorbico indotti dall' $\text{O}_3$  potrebbero influire su numerose vie metaboliche, quali la dissipazione dell'energia di eccitazione in eccesso nei tilacoidi (Müller-Moulé *et al.*, 2002 e 2004) e la sintesi di fitormoni come ABA, ET, SA e JA (Pastori *et al.*, 2003; Conklin e Barth, 2004). Poiché questi composti, in analogia a quanto ormai noto nel caso dell'infezione da patogeni, sono da considerarsi molecole-segnale necessarie alla pianta per innescare la risposta difensiva (Rao *et al.*, 2000), gli effetti dell' $\text{O}_3$  sulla loro produzione è da tempo oggetto di numerosi studi (Kobriger *et al.*, 1984; Agrawal *et al.*, 2005; Kangasjärvi *et al.*, 2005; Baier *et al.*, 2005). Le piante esibiscono una marcata emissione di ET a seguito dell'esposizione all'inquinante. Ciò è in accordo con quanto noto in letteratura circa una stretta correlazione tra l'emissione di questo ormone e la sensibilità delle specie vegetali all' $\text{O}_3$ , in termini di comparsa di lesioni fogliari (Kangasjärvi *et al.*, 2005). In base ai risultati ottenuti, è possibile affermare che sebbene l'etilene e l' $\text{H}_2\text{O}_2$  siano entrambi prodotti precocemente dalla pianta in seguito

all'esposizione all'inquinante, al fine di attivarne le difese, la specie reattiva dell'O<sub>2</sub> è da considerarsi il miglior candidato nel mediare l'elicitazione degli effetti indotti dallo *stress*. Infatti, in accordo con quanto riportato da Diara *et al.* (2005) in pioppi esposti a trattamento acuto (150 ppb, 5 ore), la sintesi di etilene è preceduta da un marcato accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Per ottenere la massima induzione di risposte difensive e per minimizzare l'influenza avversa del contaminante, il tessuto vegetale deve disporre di concentrazioni ottimali di SA, JA e ABA. L'inquinante non determina alcun cambiamento nel contenuto in SA durante il periodo di esposizione. Apparentemente, quanto affermato porterebbe a considerare questa specie come O<sub>3</sub>-resistente, in quanto piante compromesse per l'accumulo di questo ormone o con una ridotta capacità di percepirlo, manifestano una debole stimolazione delle risposte difensive che può portare all'accumulo di metaboliti tossici ed alla conseguente induzione del danno cellulare. L'approfondimento delle analisi alle 48 ore dalla fine della fumigazione ha permesso di comprendere maggiormente i meccanismi che queste piante attivano in conseguenza allo *stress*, in quanto livelli elevati di SA potenziano il circolo di amplificazione a *feedback* responsabile della produzione di un eccesso di ROS ed innescano il ciclo di PCD (Rao *et al.*, 2000). Il fatto che questa pianta non sia del tutto immune al trattamento con O<sub>3</sub> è comunque ben dimostrato anche dalla variazione del contenuto in JA. Questo composto, che deriva dall'acido linoleico seguendo un processo lipo-ossigenasi dipendente (Sembdner e Parthier, 1993), può influenzare molti aspetti nella crescita e nello sviluppo delle piante essendo capace di indurre senescenza e inibire la germinazione. In passato si riteneva che SA, ET e JA agissero in maniera lineare e del tutto indipendente nel provocare le differenti risposte di difesa; studi più recenti hanno però dimostrato che i diversi ormoni in presenza di stress biotici o abiotici interagiscono tra loro in modo complesso e sinergico (Rao e Davis, 2001; Tamaoki *et al.*, 2003). Infatti, se ET e SA sono necessari per lo sviluppo delle lesioni visibili, il JA interviene per contenere e limitarne la diffusione. In questo lavoro si osserva un notevole aumento di questo composto all'inizio del periodo di *recovery*, per poi tornare ai livelli costitutivi, in accordo con quanto già descritto da Kangasjärvi *et al.* (2005). Rao *et al.* (2002) hanno dimostrato che in piante di *A. thaliana* il trattamento con JA riduceva la produzione di SA, in risposta allo stress da O<sub>3</sub> e questo potrebbe ben spiegare come mai durante le cinque ore di trattamento il contenuto del SA non subiva variazioni significative. Le prove sperimentali che dimostrano una rapida induzione di questo ormone, sono comunque moltissime e testate su diverse specie vegetali sottoposte a *stress* di diversa natura (Creelmann e Mullet, 1995, 1997; Davis *et al.*, 2002; Pedranzani *et al.*, 2003). È ben dimostrato anche che piante esposte all'O<sub>3</sub> attivino una notevole biosintesi del JA (Rao *et al.*, 2002, Tuominen *et al.*, 2004) e che i suoi derivati

svolgono un'elevata protezione della morte cellulare ROS-indotta, limitando e quindi neutralizzando gli effetti di ET e SA. Si è osservato infatti che pretrattando le piante di tabacco con jasmonato veniva inibita la morte cellulare indotta dall'O<sub>3</sub> (Örvar *et al.*, 1997)

L'acido abscissico è un sesquiterpenoide, che si forma a partire dall'acido mevalonico coinvolgendo i carotenoidi, le neoxantine e le xantine (Merlot e Giraudat, 1997). Questo ormone agisce da regolatore della crescita (Li e Wanton, 1990), della risposta adattativa della pianta ad alcune condizioni ambientali (Mauch-Mani e Mauch, 2005) ed è anche un noto stimolatore dell'apertura stomatica. Nel nostro caso, tale ormone sembra apparentemente non essere coinvolto nella progressiva chiusura stomatica, che si è osservata nelle foglie trattate a partire dalle 5 ore di fumigazione. Il livello di ABA, infatti, da questo tempo in poi non ha subito alcuna modificazione di rilievo rispetto ai controlli, anzi ha mostrato addirittura una riduzione significativa a partire da un ora di trattamento. E' evidente, quindi, che tali risultati portano ad avallare le ipotesi per le quali la conduttanza stomatica sia in effetti alterata da più ormoni. Recentemente Acharya e Assmann (2009) hanno proposto un nuovo e complesso modello di regolazione basato su un'interazione pluri-ormonale, che coinvolge anche JA, SA, ET, auxine e citochine e addirittura brassinosteroidi (BR) (Figura 24).

Le risposte ecofisiologiche analizzate *in vivo*, mediante lo studio degli scambi gassosi e della fluorescenza della clorofilla *a*, hanno mostrato un'evidente riduzione della *performance* fotosintetica. Al termine della fumigazione e durante il periodo di *recovery*, infatti, le piante mostravano un significativo decremento nell'attività di fissazione della CO<sub>2</sub>, in associazione ad una forte riduzione della G<sub>w</sub> ed un concomitante aumento della C<sub>i</sub>.

Attraverso l'analisi della fluorescenza della clorofilla *a*, si è notato un decremento nel paramentro F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub>, che alcuni Autori considerano migliore rispetto al rapporto F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>, poiché suggerisce migliori discriminazioni su piccole differenze nell'efficienza del PSII (Pereira *et al.*, 2000). Risultati simili sono stati osservati su piante di caffè esposte a *stress* termico (Oliveira *et al.*, 2009). I risultati relativi alla fotoinibizione non mostrano particolari variazioni e questo può essere spiegato dal fatto che l'eccesso di energia viene dissipato efficacemente attraverso metodi alternativi, per esempio il ciclo delle xantofille. In particolare, c'è un aumento significativo nel contenuto in zeaxantina, dovuto all'attivazione della de-epossidazione della violaxantina che è a sua volta associato alla dissipazione dell'energia in forma di calore, contribuendo così al *quenching* non fotochimico (cfr. appendice).

In conclusione, è possibile affermare che la melissa presenta un'elevata sensibilità agli episodi puntiformi di O<sub>3</sub>, manifestata in termini di effetti macroscopici e danni alle membrane; riduzione

della *performance* fotosintetica ( $A_{\max}$  e  $F_v/F_0$ ), attivazione del ciclo delle xantofille e la riduzione del contenuto in clorofille, unitamente al progressivo disequilibrio tra generazione e detossificazione delle ROS mediante sistemi antiossidanti.

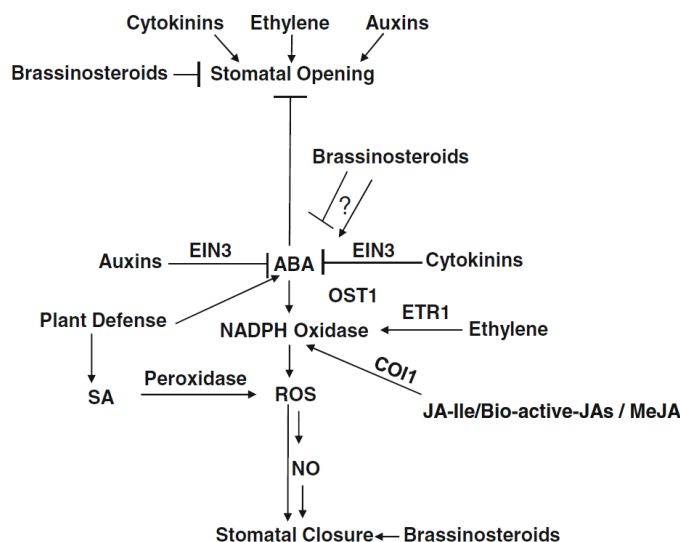


Figura 24 – Modello proposto per la spiegazione dell'interazione ormonale nella regolazione dell'apertura stomatica. Da Acharya e Assmann (2009).

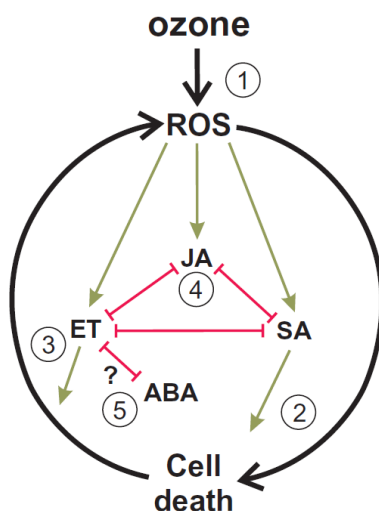


Figura 25 – L'ozono stimola la produzione di specie reattive dell'ossigeno, le quali, a loro volta, fungono da induttori e regolatori della risposta ormonale morte cellulare programmata (Kangasjärvi *et al.*, 2005).

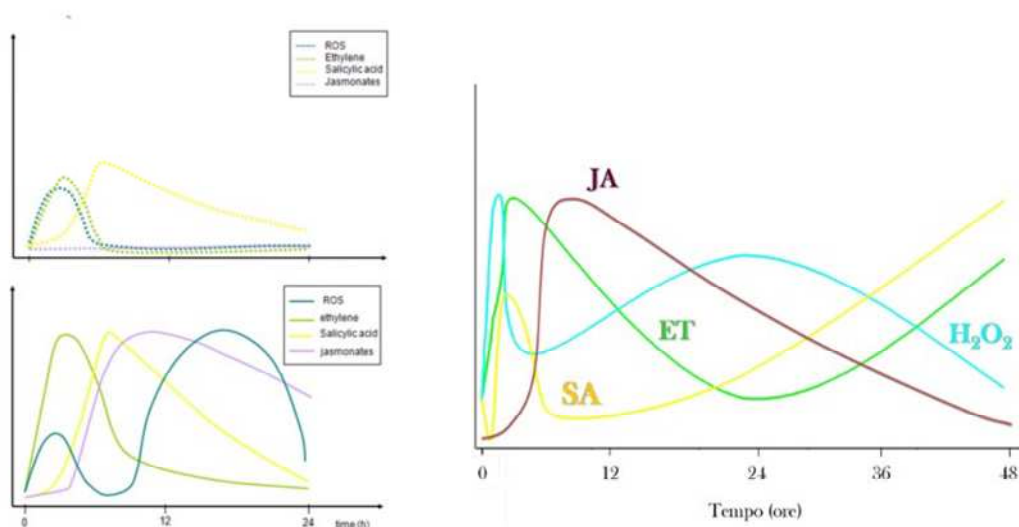


Figura 26 – Variazioni temporali nell'attivazione e accumulo di molecole segnale, indotte da esposizioni puntiformi all'ozono in piante resistenti (*in alto a sinistra*), sensibili (*in basso a sinistra*) (Kangasjärvi *et al.*, 2005) e in *Melissa officinalis* (*a destra*).

### 3.2. Esposizione cronica

#### 3.2.1. Risultati esposizione cronica

*Analisi molecolari e funzionali di enzimi e metaboliti del pathway biosintetico dell'acido rosmarinico e altri fenoli e flavonoidi*

Al fine di capire in che modo l'O<sub>3</sub> possa agire e apportare alterazioni a carico del metabolismo secondario, sono stati condotti *test* su piante di controllo e sottoposte a trattamento con l'inquinante, prendendo in considerazione tre dei principali geni coinvolti nella sintesi del RA, ovvero quelli che esprimono per l'attività di PAL, 4CL e RAS. Mediante estrazione di RNA e successiva PCR con utilizzo di *primer* specifici, per ciascuno di questi geni sono stati quantificati i livelli di trascrizione relativi, ottenuti per confronto con il gene dell'actina, *housekeeping* e quindi costitutivamente espresso dalle cellule, indipendentemente dal ciclo cellulare. L'RNA è stato isolato da foglie trattate e di controllo dopo 7, 14 e 35 giorni dall'inizio della fumigazione. Il rapporto 260/280, indice della qualità dell'acido nucleico ottenuto, è riportato in Tabella 1.

Tabella 1 – RNA totale ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) isolato da foglie di *Melissa officinalis* di controllo e trattate con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi) a 0, 7, 14 e 35 giorni dall'inizio della fumigazione. I valori sono riportati come media  $\pm$  deviazione *standard*.

	Tempo zero	Controllo (7 giorni)	Trattato (7 giorni)	Controllo (14 giorni)	Trattato (14 giorni)	Controllo (35 giorni)	Trattato (35 giorni)
Rapporto 260/280	1,51	1,96	1,53	1,78	1,72	1,79	1,49
RNA totale ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	252,2 $\pm$ 34,23	143,5 $\pm$ 23,46	204,8 $\pm$ 16,34	153,6 $\pm$ 28,76	107,5 $\pm$ 45,47	415,4 $\pm$ 34,74	167,3 $\pm$ 45,91

Nelle Figure 27, 28 e 29 sono riportati i grafici relativi ai livelli di trascrizione dei tre geni presi in considerazione. Da questa analisi è emerso un comportamento simile dei geni RAS e 4CL; infatti nelle piante sottoposte al trattamento si è osservato, solo dopo la prima settimana, un notevole incremento del trascritto pari rispettivamente al 340% (Figura 28) e 360% (Figura 29) con un successivo ritorno ai livelli costitutivi nei successivi giorni.

L'espressione del gene PAL subiva un incremento dopo 7 giorni di fumigazione (seppur meno marcato e corrispondente a circa il 10%) con una successiva diminuzione del 35% all'ultimo tempo di analisi. Al momento, sono in corso indagini riguardanti le prime ore di esposizione



dell'inquinante. Trattandosi infatti, di risposte quasi immediate è abbastanza probabile che modifiche a carico del trascritto avvengano proprio dopo una o due ore dall'inizio del trattamento.

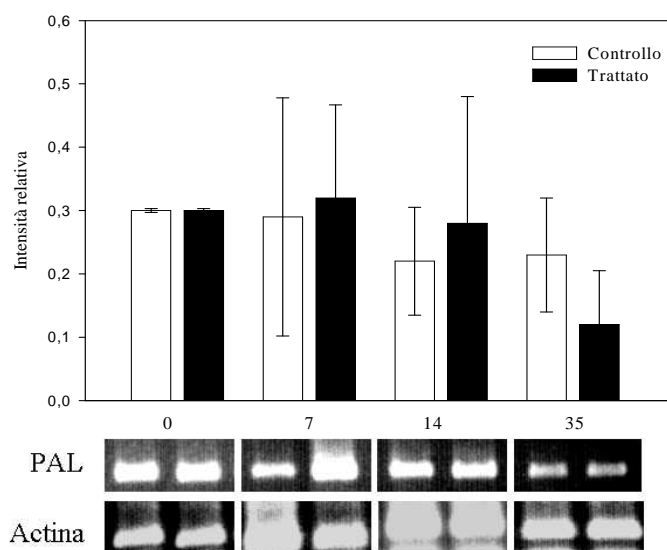


Figura 27 – Analisi dell'espressione del gene fenilalanina ammonio liasi in piante di *Melissa officinalis* di controllo e sottoposte a fumigazione con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi) a 0, 7, 14 e 35 giorni dall'inizio del trattamento. È riportata graficamente l'intensità delle bande ottenute a seguito di PCR e separazione elettroforetica, in relazione all'intensità della banda del gene dell'actina.

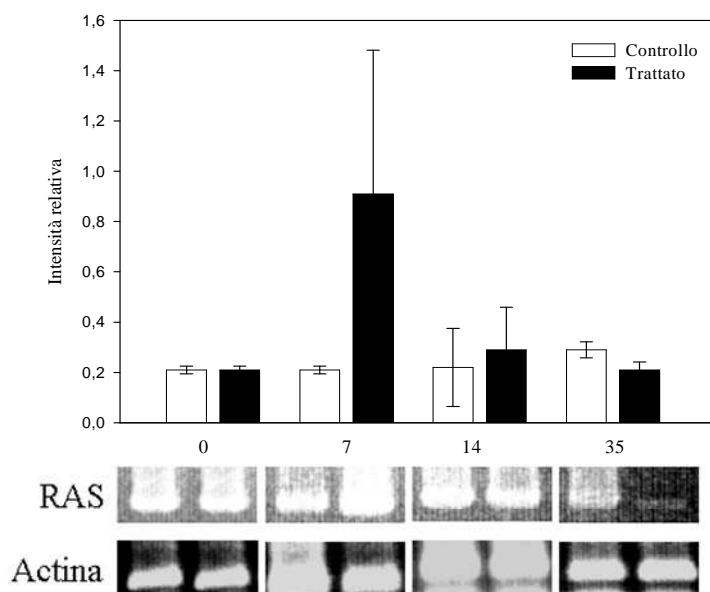


Figura 28 – Analisi dell'espressione del gene acido rosmarinico sintasi in piante di *Melissa officinalis* di controllo e sottoposte a fumigazione con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi) a 0, 7, 14 e 35 giorni dall'inizio del trattamento. È riportata graficamente l'intensità delle bande ottenute a seguito di PCR e separazione elettroforetica, in relazione all'intensità della banda del gene dell'actina.

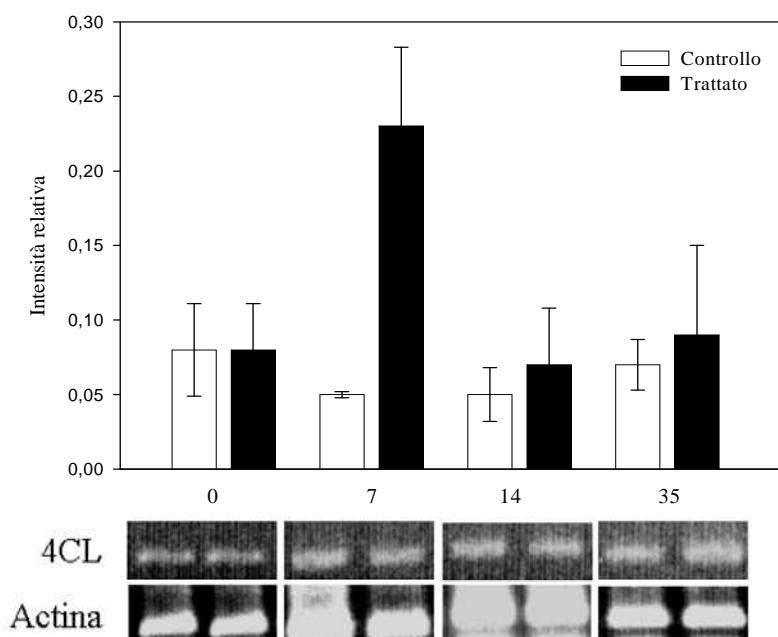


Figura 29 – Analisi dell'espressione del gene 4cinnamoil:coenzima A ligasi in piante di *Melissa officinalis* di controllo e sottoposte a fumigazione con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi) a 0, 7, 14 e 35 giorni dall'inizio del trattamento. È riportata graficamente l'intensità delle bande ottenute a seguito di PCR e separazione elettroforetica, in relazione all'intensità della banda del gene dell'actina.

Dopo aver analizzato e confermato l'effettiva alterazione a livello di geni caratterizzanti il metabolismo secondario (attraverso lo studio della via dell'acido scichimico e della biosintesi del RA), sono state valutate le possibili variazioni funzionali a carico della PAL, enzima chiave tra metabolismo primario e secondario. In Figura 30 sono riportate le analisi condotte per saggiarne l'attività specifica. Dopo due settimane di trattamento, si riscontrano nelle piante ozonate alti livelli di attivazione enzimatica che perdurano e, anzi, appaiono amplificati enormemente (di 13 volte) alla fine del trattamento.

Come riportato in numerosi lavori (Zgòrka e Głowniak 2001; Ziakova *et al.*, 2003; Dastmalchi *et al.*, 2008), le *Lamiaceae* sono piante ricche in fenoli acidi (acido protocatecuico, *p*-idrossibenzoico, caffeico, *p*-cumarico, *m*-cumarico, *o*-cumarico e rosmarinico) e flavonoidi, in modo particolare apigenina, naringenina e esperetina (Dastmalchi *et al.*, 2008).

Il principale composto fenolico della melissa è rappresentato dal RA, che nelle foglie di controllo presenta concentrazioni attestabili intorno ai  $24,3 \pm 1,83$  mg g<sup>-1</sup> (PS); in seguito a trattamento, il suo contenuto aumentava progressivamente in modo significativo: dopo 35 giorni di fumigazione, i valori di questo parametro erano aumentati del 54% nelle piante trattate, rispetto a quelle mantenute in aria filtrata (Figura 31).

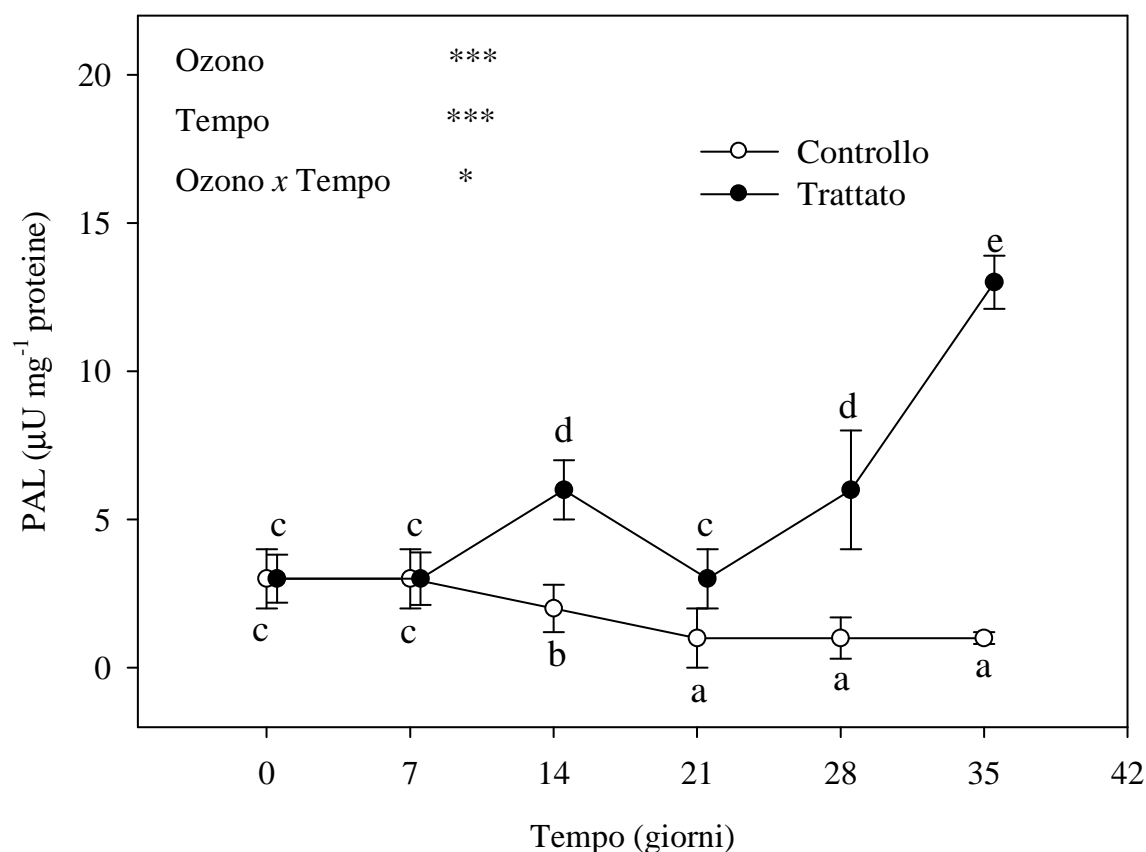


Figura 30 – Analisi bifattoriale (ozono e tempo di esposizione) dell'attività della fenilalanina ammonio liasi in piante di *Melissa officinalis* di controllo e trattate con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi). I valori, sono riportati come media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ) in base ad ANOVA a due vie seguita da *test* LSD.

L'acido *trans*-cinnamico ha subito un incremento già dopo due settimane di trattamento (+133% rispetto ai controlli), mantenendo tale andamento nei restanti tempi di analisi. Anche il contenuto fogliare di acido protocatecuico subiva un marcato aumento dopo 14 e 35 giorni dell'esposizione all'O<sub>3</sub> (+200 e +250% rispetto al materiale mantenuto in aria filtrata) (Figura 31).

I flavonoidi ritrovati nelle piante oggetto di studio sono: apigenina (il principale da un punto di vista quantitativo), esperetina, esperidina e luteolina. A seguito del trattamento, tutti questi composti (eccetto la luteolina, *dati non mostrati*) subivano un significativo incremento rispettivamente dopo 7 [apigenina (+33%) ed esperidina (+55%)] e 14 [esperetina (+34%)] giorni di trattamento che si protraeva nei restanti tempi di analisi (Figura 32).

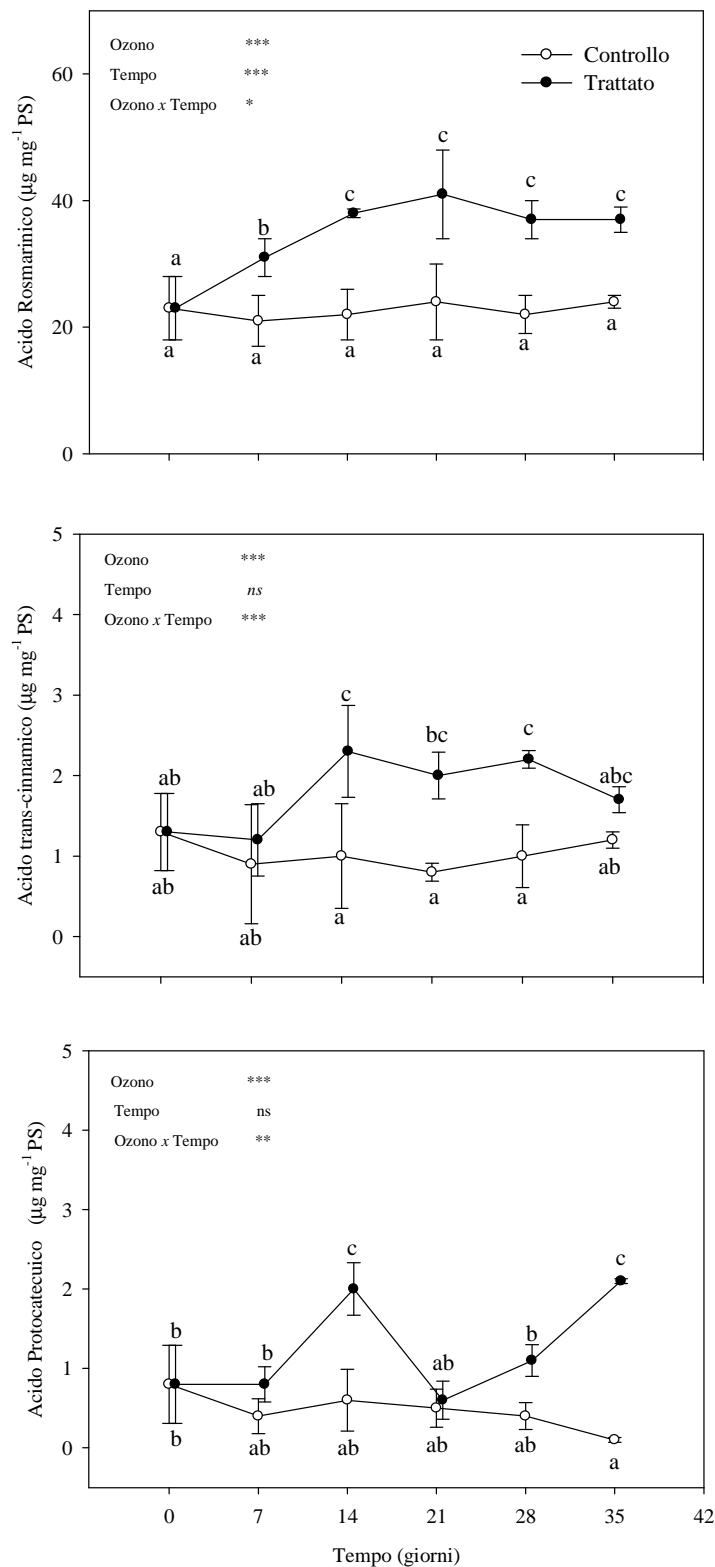


Figura 31 – Analisi bifattoriale (ozono e tempo di esposizione) del contenuto in acidi fenolici (acido rosmarinico, acido *trans*-cinnamico e acido protocatecuico) in piante di *Melissa officinalis* di controllo e trattate con ozono (80 ppb, 5 ore  $\text{d}^{-1}$  per 35 giorni consecutivi). I valori sono riportati come media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ) in base ad ANOVA a due vie seguita da *test* LSD.

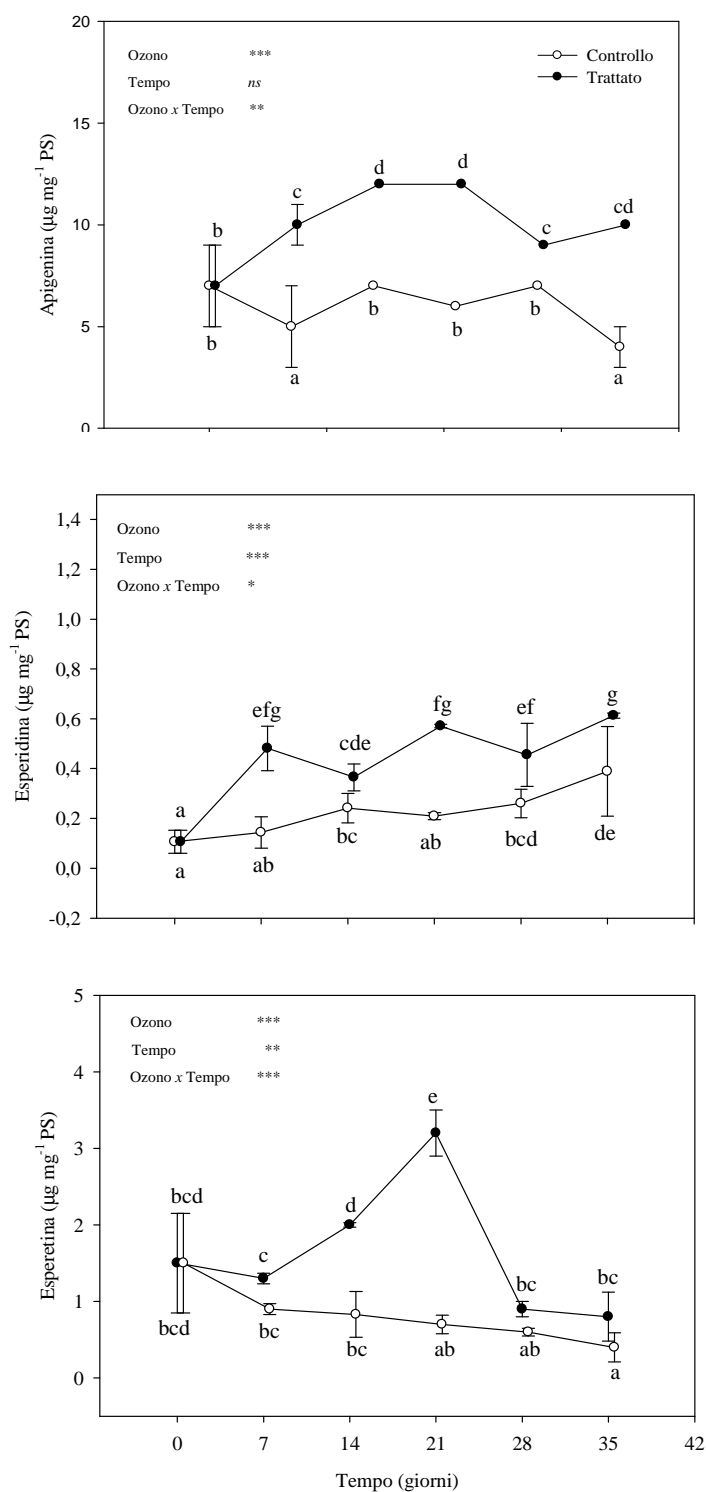


Figura 32 – Analisi bifattoriale (ozono e tempo di esposizione) del contenuto in flavonoidi (apigenina, esperidina ed esperetina) in piante di *Melissa officinalis* di controllo e trattate con ozono (80 ppb, 5 ore  $\text{d}^{-1}$  per 35 giorni consecutivi). I valori, sono riportati come media  $\pm$  deviazione standard. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ) in base ad ANOVA a due vie seguita da test LSD.

*Produzione di ROS e integrità delle membrane*

Riguardo ai livelli di perossidazione della membrana, è stato possibile osservare che entrambi i fattori presi in esame determinavano un effetto altamente significativo. In particolare, è stato registrato un evidente aumento del contenuto nei prodotti di reazione con l'acido tiobarbiturico nelle piante esposte all'O<sub>3</sub> che risultava di ben tre volte superiore rispetto a quello dei controlli già a 14 giorni dall'inizio del trattamento (Figura 33) a dimostrazione di una effettiva alterazione dell'integrità delle membrane.

Per quanto riguarda le misure relative alla conducibilità elettrica, non sono mai state registrate variazioni statisticamente significative (*dati non mostrati*); come riportato in Figura 34, l'RWC ha mostrato un leggero decremento nelle piante ozonate rispetto a quelle mantenute in aria filtrata solo nelle ultime settimane di analisi (-19 e -13%, rispettivamente a 28 e 35 giorni di trattamento).

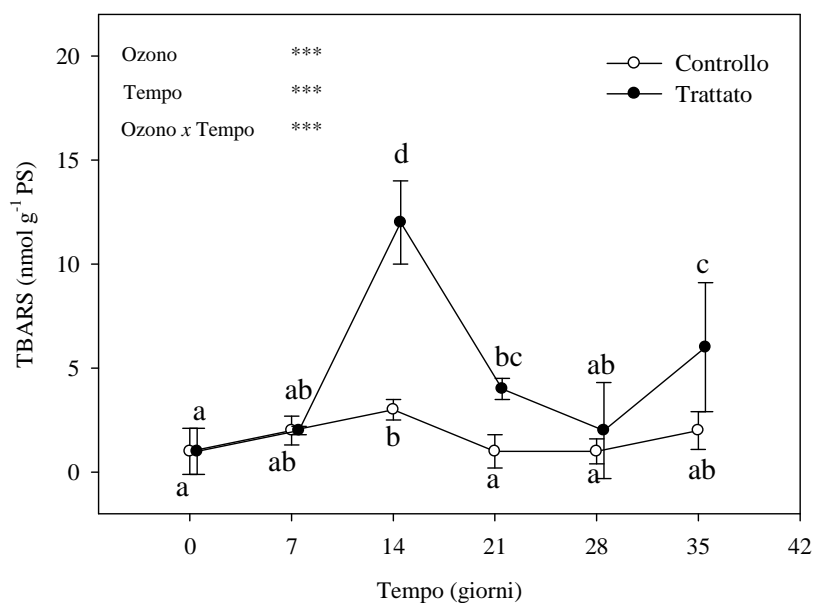


Figura 33 – Analisi bifattoriale (ozono e tempo di esposizione) sui livelli di acido tiobarbiturico saggiati su piante di *Melissa officinalis* di controllo e trattate con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi). I dati sono riportati come media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ) in base ad ANOVA a due vie seguita da *test* LSD.

Già dopo 7 giorni di fumigazione, è stato osservato un incremento del 20% del contenuto in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rispetto alle piante di controllo, che perdura per i successivi tempi di analisi e vive un picco al termine del trattamento (+45%) (Figura 35).

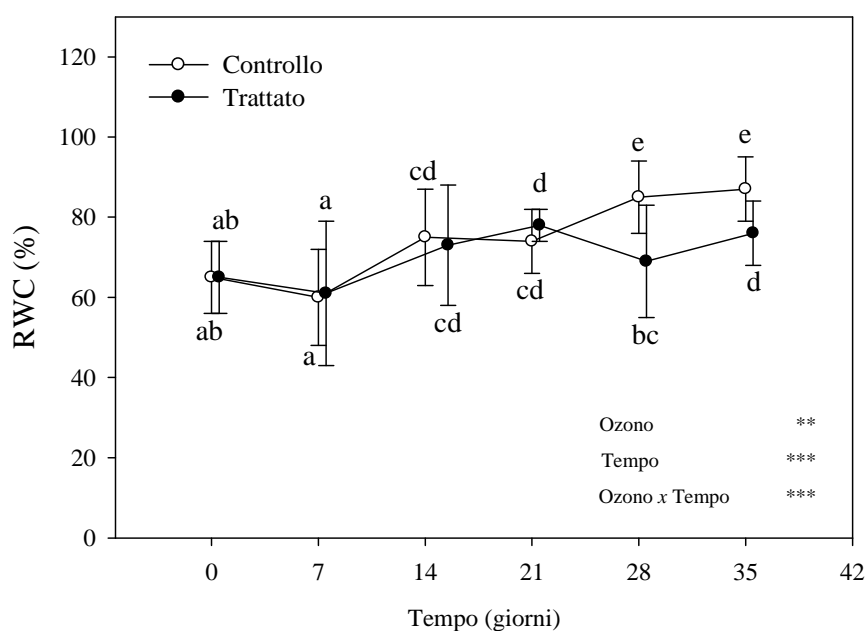


Figura 34 – Analisi bifattoriale (ozono e tempo di esposizione) del contenuto idrico relativo saggiato su piante di *Melissa officinalis* di controllo e trattate con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi). I dati sono riportati come media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ) in base ad ANOVA a due vie seguita da *test* LSD.

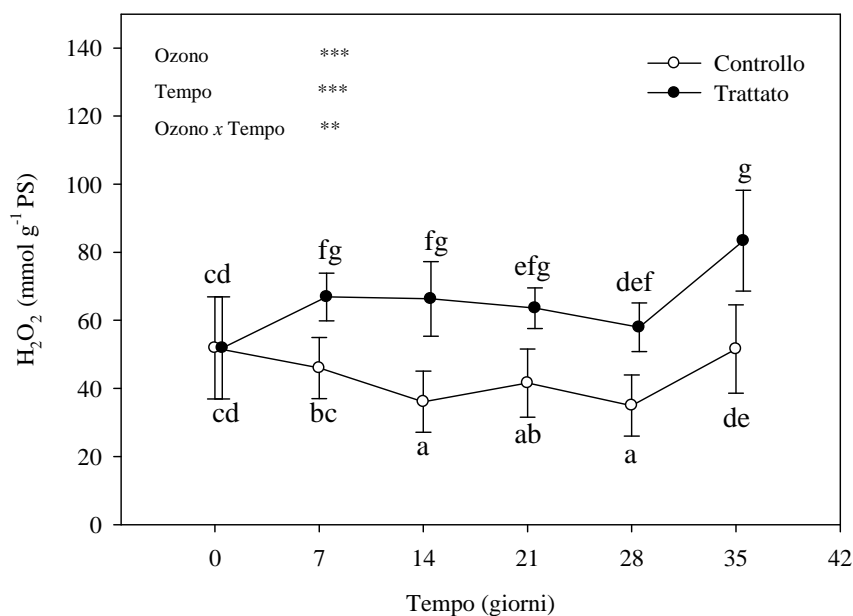


Figura 35 – Analisi bifattoriale (ozono e tempo di esposizione) dell'accumulo di acqua ossigenata, saggiato su piante di *Melissa officinalis* di controllo e trattate con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi). I dati sono riportati come media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ) in base ad ANOVA a due vie seguita da *test* LSD.

*Risposte fisiologiche e biochimiche legate al processo fotosintetico*

Le analisi delle risposte ecofisiologiche sono state effettuate *in vivo* durante i 35 giorni di analisi con cadenza settimanale. In merito agli scambi gassosi, si osservava una diminuzione di  $A_{\max}$  e  $G_w$  già dopo sette giorni pari rispettivamente a -44% (Figura 36, *in alto*) e -36% (Figura 36, *al centro*) rispetto a quelli mantenuti in aria filtrata. L'andamento decrescente veniva mantenuto sino al termine dell'esposizione, dove si raggiungeva un decremento del livello di fissazione della  $CO_2$  pari al 45%. Nessuna variazione significativa è stata riscontrata per la  $C_i$  (*dati non mostrati*) mentre un andamento altalenante è stato osservato in  $WUE_i$  (Figura 36, *in basso*).

Al fine di valutare l'efficienza della fotosintesi sia in funzione di valori crescenti di PAR sia in relazione alla concentrazione di  $CO_2$  esterna sono state ottenute rispettivamente curve luce e  $A/C_i$ . E' stato possibile osservare un progressivo abbassamento dei livelli di saturazione luminosa delle foglie trattate già a partire dalla prima settimana di analisi, che mostravano una riduzione del 60% rispetto ai controlli; e il raggiungimento di un *plateau* a concentrazioni di  $CO_2$  pari a 600 ppm negli individui sottoposti a fumigazione contro valori di circa 1000 ppm per individui mantenuti in aria filtrata (*dati non mostrati*).

Anche i valori di  $V_{\max}$  e  $R_d$  hanno subito una significativa variazione, con un decremento nel corso del trattamento già alla prima settimana di analisi (-44% e -36%, rispettivamente per  $V_{\max}$  e  $R_d$ ) e al termine dell'esposizione (-26% e -22% , rispettivamente per  $V_{\max}$  e  $R_d$ ) (Figura 37). Un diverso comportamento si è invece osservato per  $J_{\max}$ , che nelle foglie sottoposte a *stress* ossidativo subiva un calo nei primi sette giorni di analisi (-30% rispetto a quelle di controllo), per poi tornare ai livelli più simili, ma comunque inferiori, degli individui mantenuti in aria filtrata (Figura 37, *in basso*).

La diminuzione dell'attività fotosintetica dovrebbe indurre un'alterazione della produzione di zuccheri solubili ed amido. Nel nostro studio si è osservato che nelle piante trattate la concentrazione di zuccheri solubili totali (saccarosio, fruttosio e glucosio) si assestava intorno ai livelli costitutivi per l'intero *time course*. Un comportamento piuttosto anomalo è stato riscontrato per il contenuto in amido: dopo 14 giorni dall'inizio della fumigazione, negli individui ozonati si è registrato un aumento del 150% per poi subire una diminuzione del 46% all'ultimo tempo di analisi (Figura 38).

Dai risultati delle analisi relativi alla fluorescenza della clorofilla *a*, è emerso che il rapporto  $F_v/F_0$ , frequentemente utilizzato come indicatore di fotoinibizione o di altri tipi di *stress* a carico del PSII (Krause e Weis, 1991; Roháček, 2002; Calatayud e Barreno, 2004), ha subito riduzioni, seppur modeste, già dopo sette giorni di esposizione (Figura 39, *in alto a destra*).



## Risultati e discussione

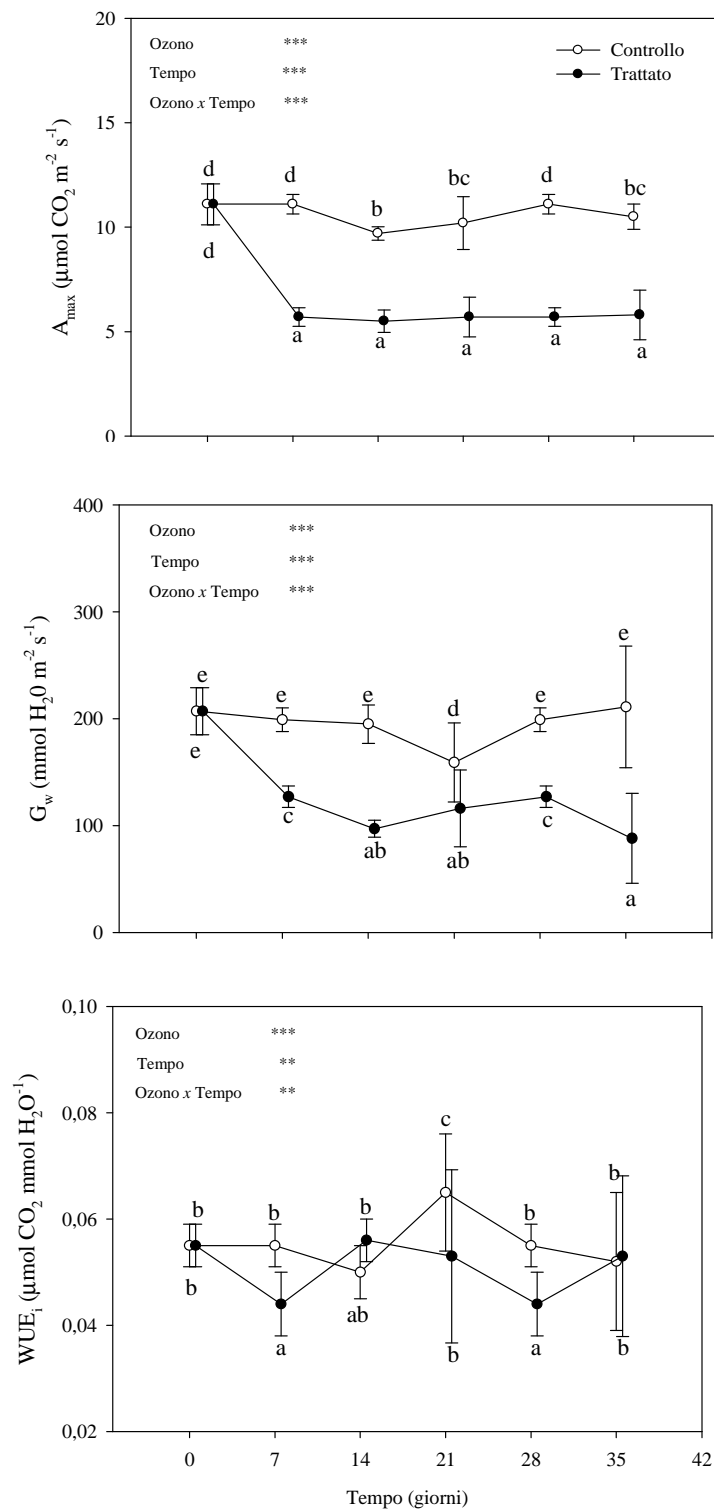


Figura 36 – Analisi bifattoriale (ozono e tempo di esposizione) dei parametri relativi a: attività fotosintetica a luce saturante (*in alto*), conduttanza stomatica (*al centro*), efficienza d'uso dell'acqua (*in basso*) in piante di *Melissa officinalis* di controllo e trattate con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi). I dati espressi sono riportati come media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ) in base ad ANOVA a due vie seguita da *test* LSD.

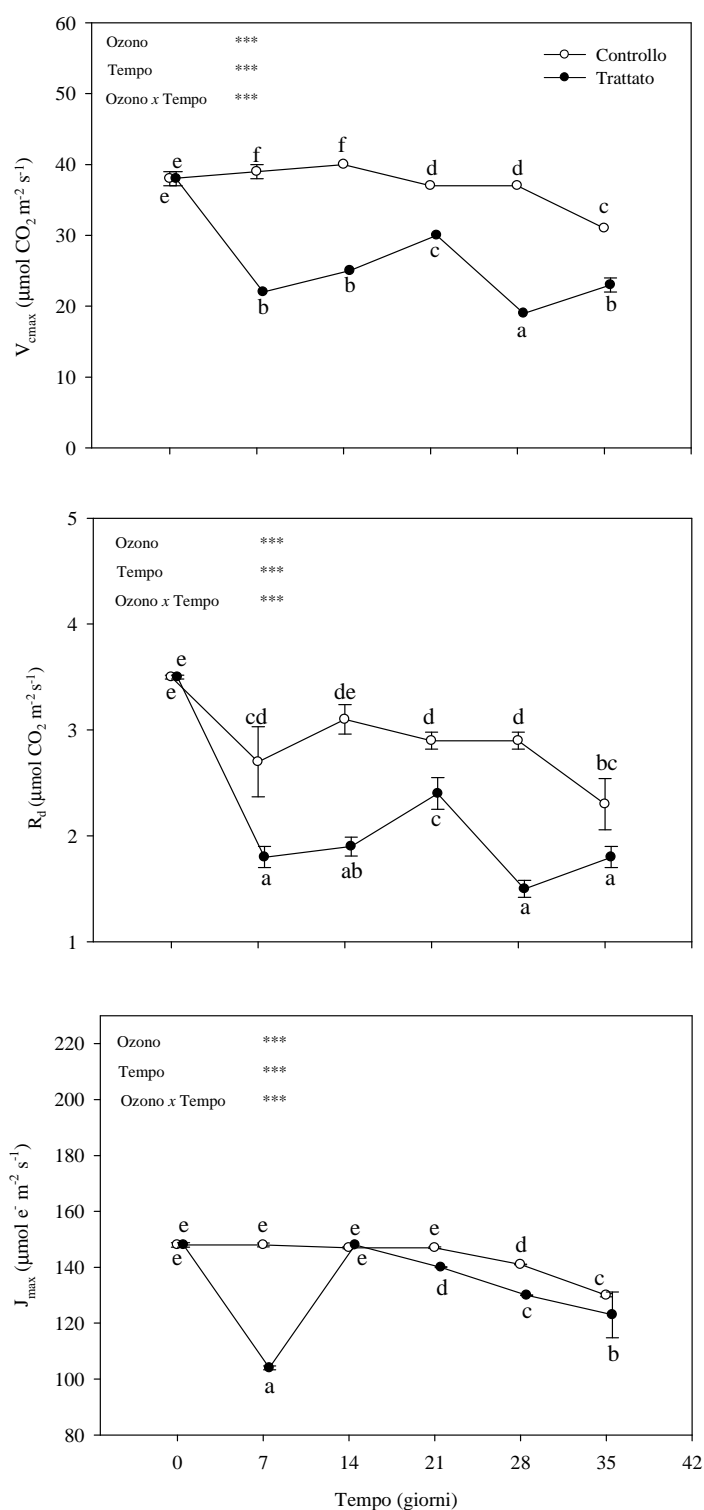


Figura 37 – Analisi bifattoriale (ozono e tempo di esposizione) dei parametri relativi a: velocità di carbossilazione massima della RuBisCO *in vivo* (*in alto*); ritmo di respirazione mitocondriale in presenza di luce (*al centro*); velocità massima del trasporto elettronico (*in basso*) in piante di *Melissa officinalis* di controllo e trattate con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi). I valori sono riportati come media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ) in base ad ANOVA a due vie seguita da *test* LSD.

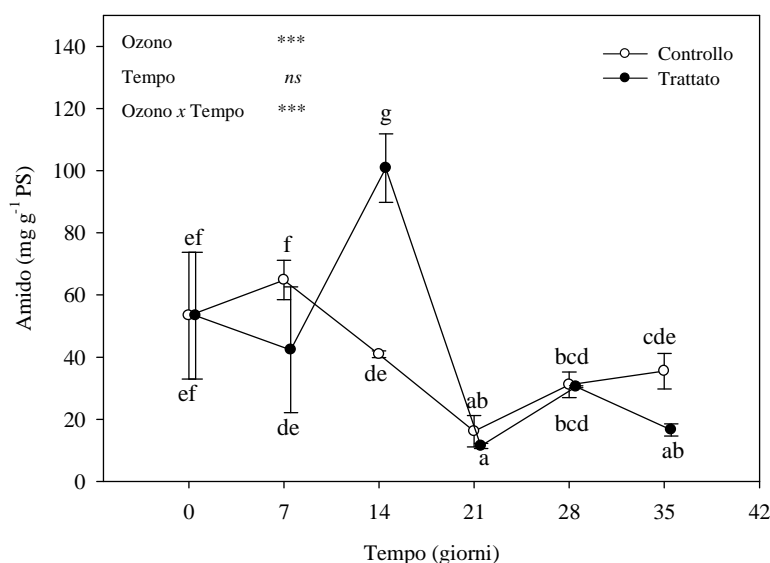


Figura 38 – Analisi bifattoriale (ozono e tempo di esposizione) del contenuto di amido in piante di *Melissa officinalis* di controllo e trattate con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup>, per 35 giorni consecutivi). I valori sono riportati come media  $\pm$  deviazione standard. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ) in base ad ANOVA a due vie seguita da *test* LSD.

Al termine del trattamento le piante mostravano una riduzione di questo rapporto (pari al 18% rispetto ai controlli) imputabile principalmente ad un forte e significativo decremento dei valori di  $F_m$  (dati non mostrati). Anche  $q_P$  e ETR hanno subito significative diminuzioni, ma degni di nota solo alla fine del trattamento, quando nei trattati sono stati raggiunti valori inferiori ai controlli del 16% e 17%, rispettivamente. Andamento oscillante ha avuto, invece, il parametro  $q_{NP}$  con variazioni contrastanti a 7 e 21 giorni dall'inizio della fumigazione (+13% e -32%, rispettivamente) (Figura 39, in basso). L'analisi del *quenching* della fluorescenza permette di stimare la frazione di luce assorbita dal sistema antenna del PSII dissipata (i) sotto forma di energia fotochimica (espressa come %P, equivalente a  $\Phi_{PSII}$ ), (ii) termicamente dal sistema antenna (%D) ed infine (iii) come energia che non viene usata né in forma fotochimica né dal sistema antenna (%X). Negli individui trattati, dopo 21 giorni dall'inizio della fumigazione, si osservava un significativo aumento dei livelli di %P (+15% rispetto ai controlli) (Figura 40, in alto), che risultava concomitante con decremento dei valori di %D (-16% rispetto al materiale di controllo) (Figura 40, in basso). Per quanto riguarda la % X, questa non presentava alterazioni significative per nessuno dei fattori analizzati né tanto meno per la loro interazione (dati non mostrati).

In Figura 41 sono riportati i risultati delle analisi del contenuto in pigmenti fotosintetici effettuate su foglie di melissa trattate e non con  $O_3$ . Nelle piante fumigate, già dopo 7 giorni dall'inizio dell'esposizione, si osservava una significativa riduzione dei livelli di clorofilla *a* (-24% rispetto ai controlli), mentre la clorofilla *b* mostrava una variazione esclusivamente al termine del

trattamento (-78% rispetto al materiale mantenuto in aria filtrata). Tali decrementi sono responsabili dei cali significativi registrati a 7 e a 35 giorni dall'inizio dell'esposizione rispettivamente del contenuto totale di clorofilla (-75% rispetto ai controlli) e del rapporto tra clorofilla *a* e *b* (+17% rispetto a materiale di controllo). Dai risultati dell'ANOVA è possibile osservare come per i pigmenti accessori soltanto il fattore O<sub>3</sub> risultava significativo (*dati non mostrati*); per questo motivo, in Tabella 2 sono riportati i dati relativi al contenuto di questi composti al termine del trattamento. L'esposizione all'inquinante determinava una significativa riduzione rispetto ai controlli non soltanto del contenuto in xantofille (-11, -70, -78 e -76% rispettivamente di neoxantina, violaxantina, anteraxantina e zeaxantina), ma anche dei carotenoidi (-68 e -70% rispettivamente di luteina e  $\beta$ -carotene).

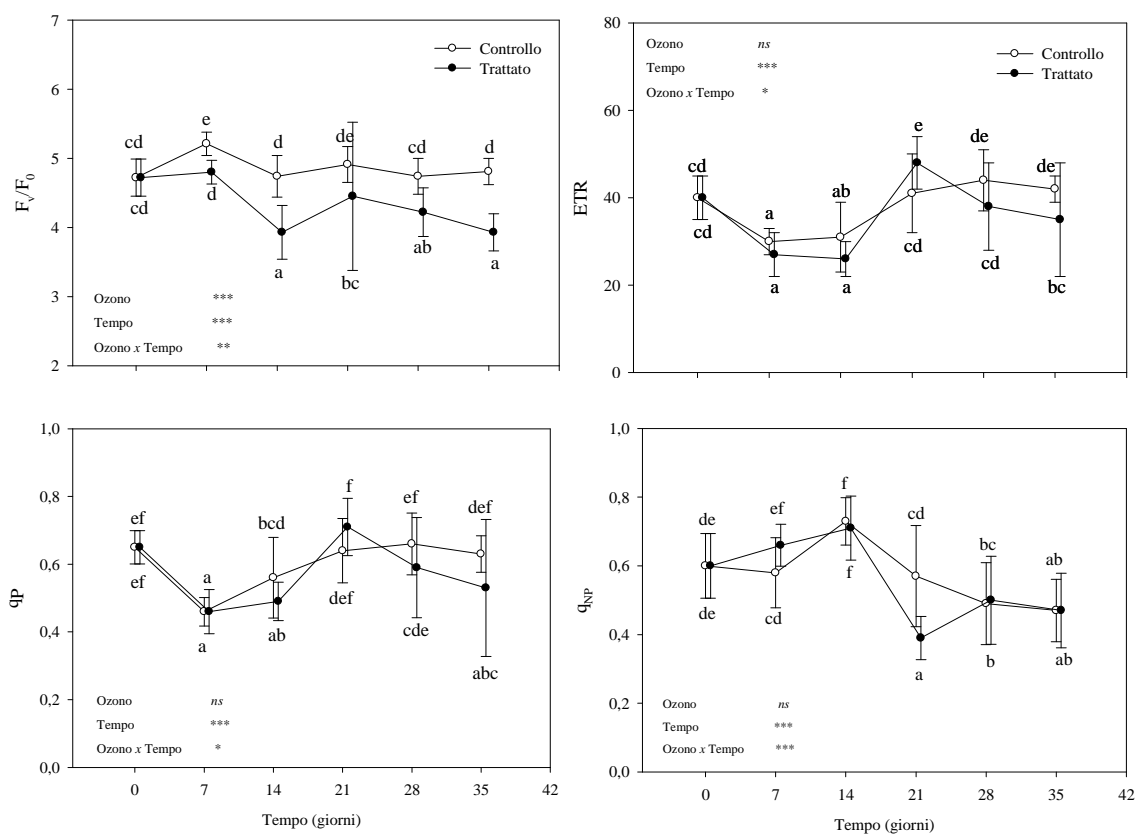


Figura 39 – Analisi bifattoriale (ozono e tempo di esposizione) dei parametri di fluorescenza della clorofilla *a* in piante di *Melissa officinalis* di controllo e trattate con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi). Rapporto tra fluorescenza variabile e fluorescenza minima (*in alto a sinistra*); ritmo di trasporto elettronico (*in alto a destra*); quenching fotochimico (*in basso a sinistra*); quenching non fotochimico (*in basso a destra*). I valori, sono riportati come media  $\pm$  deviazione standard. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ) in base ad ANOVA a due vie seguita da test LSD.

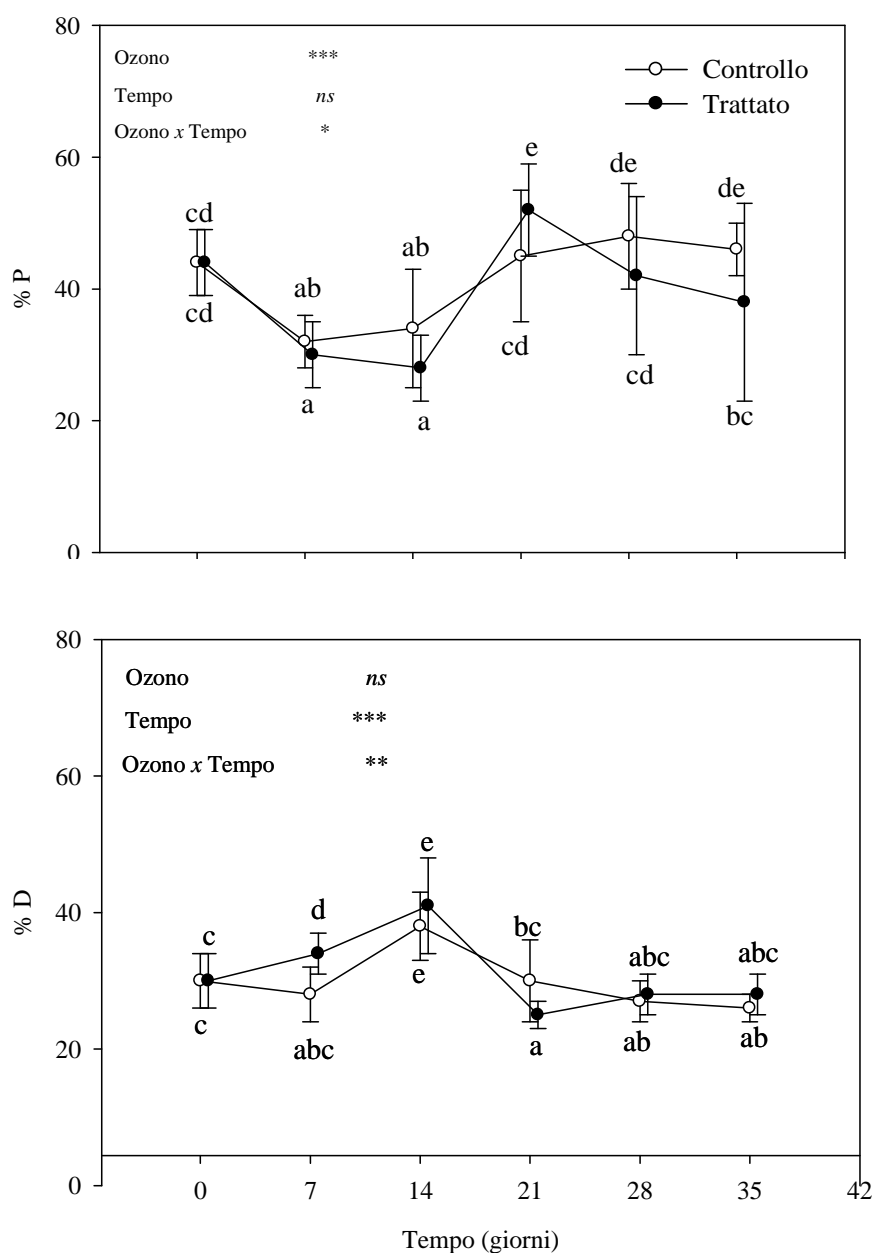


Figura 40 – Analisi bifattoriale (ozono e tempo di esposizione) della frazione di luce assorbita dal sistema antenna del PSII, dissipato sotto forma di energia fotochimica (*in alto*), energia dissipata termicamente dal sistema antenna (*in basso*), calcolate in piante di *Melissa officinalis* di controllo e sottoposte a trattamento con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi). I valori sono riportati come media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ) in base ad ANOVA a due vie seguita da *test* LSD.

In Figura 42 sono riportati i risultati delle determinazioni riguardanti il DEPS. Dopo una settimana di esposizione, era possibile evidenziare un marcato incremento dei livelli di questo parametro del +150%, che, però, non si manteneva per l'intero periodo di esposizione.

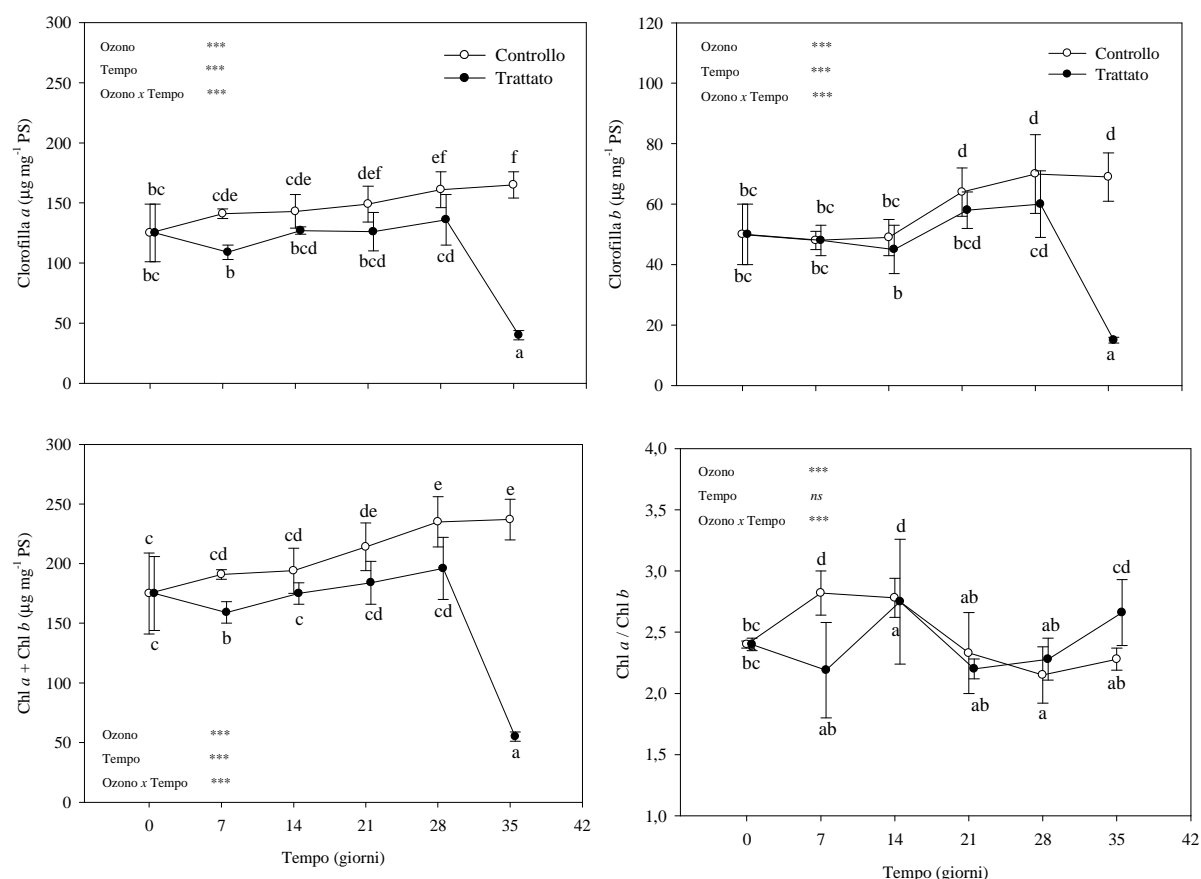


Figura 41 – Analisi bifattoriale (ozono e tempo di esposizione) del contenuto di clorofilla *a* (in alto a sinistra), clorofilla *b* (in alto a destra), clorofilla totale (in basso a sinistra) e rapporto tra clorofilla *a* e *b* (in basso a destra) in piante di *Melissa officinalis* di controllo e trattate con ozono (80 ppb, 5 ore  $\text{d}^{-1}$  per 35 giorni consecutivi). I valori sono riportati come media  $\pm$  deviazione standard. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ) in base ad ANOVA a due vie seguita da test LSD.

#### Capacità antiossidante totale dell'estratto fogliare e dell'olio essenziale

È stata stimata l'attività antiossidante degli estratti metanolici fogliari mediante saggi ORAC e HORAC. Nel primo test è stato evidenziato un progressivo e costante aumento dell'attività biologica nel corso di tutta la sperimentazione, che raggiungeva i più alti livelli proprio al termine della stessa (+80%, rispetto ai controlli) (Figura 43).

L'olio essenziale è stato estratto al termine dei 35 giorni di trattamento da ugual quantitativo di biomassa fresca, trattata e non con  $\text{O}_3$ . È stata osservata una sensibile differenza nella resa, [espressa come  $\mu\text{l } 100 \text{ g}^{-1}$  di peso fresco (PF)] che nelle di foglie sottoposte a *stress* ossidativo mostava un aumento del 15% rispetto a quelle di controllo. Anche sull'essenza è stata stimata la capacità antiossidante con saggi HORAC e ORAC e solo quest'ultimo ha fornito variazioni statisticamente significative a favore delle piante ozonate, mentre meno chiara è risultata la situazione registrata dalle analisi HORAC dove, dopo 35 giorni di trattamento, si è riscontrato un

aumento della capacità dell'essenza di azione contro i radicali idrossili, sebbene tale tendenza risulti non statisticamente significativa, data la grande variabilità del campione testato (Tabella 3).

Tabella 2 – Analisi del contenuto fogliare in pigmenti fotosintetici in piante di *Melissa officinalis* di controllo e trattate con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi). I valori riportati, rappresentano la media  $\pm$  deviazione *standard*. I dati sono stati esaminati con un *test* di comparazione a coppie (*Student's t-test*); gli asterischi indicano le differenze significative tra il controllo e il materiale ozonato per: \*\*\* =  $P \leq 0,001$ ; \*\* =  $P \leq 0,01$ ; \* =  $P \leq 0,05$ .

Composto (mg g <sup>-1</sup> PS)	Controllo	Ozono	P
$\beta$ -carotene	77,7 $\pm$ 10,31	22,9 $\pm$ 1,97	***
Luteina	2,2 $\pm$ 0,22	0,7 $\pm$ 0,13	*
Neoxantina	8,1 $\pm$ 1,27	7,2 $\pm$ 1,55	***
Violaxantina	15,0 $\pm$ 0,83	4,4 $\pm$ 0,71	***
Anteraxantina	1,7 $\pm$ 0,73	0,4 $\pm$ 0,05	**
Zeaxantina	1,4 $\pm$ 0,21	0,3 $\pm$ 0,11	***
VAZ	18,1 $\pm$ 1,11	5,2 $\pm$ 0,82	***

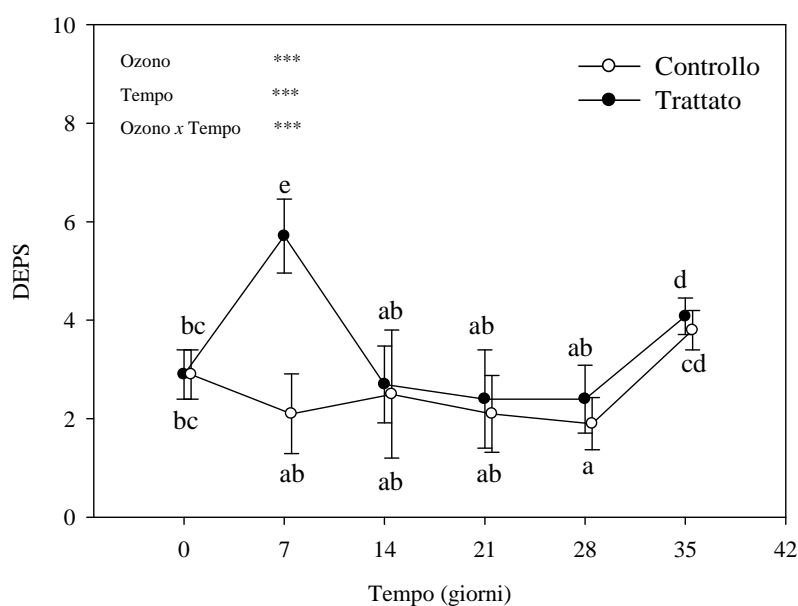


Figura 42 – Analisi bifattoriale (ozono e tempo di esposizione) dell'indice di depossidazione calcolato in piante di *Melissa officinalis* di controllo e trattate con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi). I valori sono riportati come media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ) in base ad ANOVA a due vie seguita da *test* LSD.

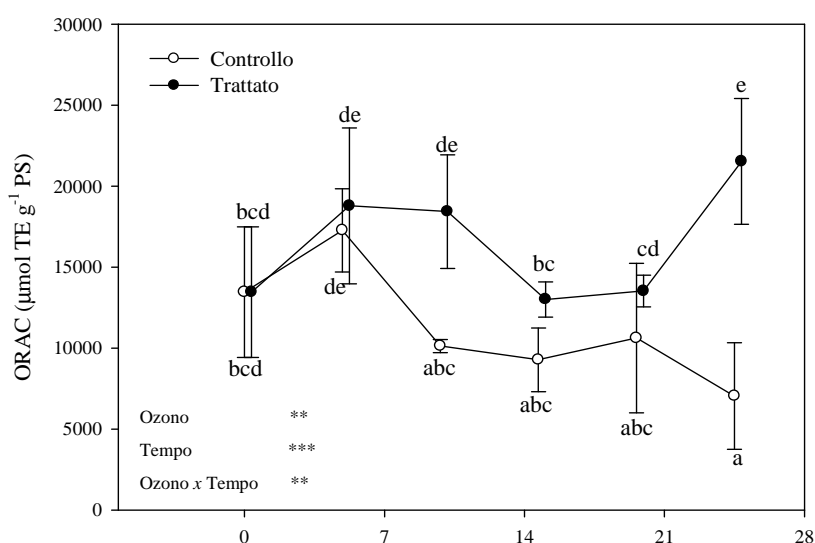


Figura 43 – Analisi bifattoriale (ozono e tempo di esposizione) della capacità antiossidante valutata mediante analisi saggio ORAC sull’estratto fogliare di piante di *Melissa officinalis* di controllo e trattate con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi). I valori, sono riportati come media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ) in base ad ANOVA a due vie seguita da *test* LSD.

Tabella 3 – Analisi della capacità antiossidante dell’olio essenziale estratto mediante distillazione da foglie di *Melissa officinalis* di controllo e fumigate con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi) al termine del trattamento. I valori sono riportati come media  $\pm$  deviazione *standard*; I dati sono stati esaminati con un *test* di comparazione a coppie (*Student’s t-test*); gli asterischi indicano le differenze significative tra il controllo e il materiale ozonato per: \*\*\*=  $P \leq 0,001$ ; ns =  $P > 0,05$ .

Saggio	Controllo			Ozono			P
Unità ORAC ( $\mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ PS}$ )	1416	$\pm$	19,9	1532	$\pm$	30,1	***
Unità HORAC ( $\mu\text{mol GAE g}^{-1} \text{ PS}$ )	459	$\pm$	161,7	311	$\pm$	119,2	ns

#### Manifestazione sintomatiche e analisi dei parametri di crescita

Dopo quattordici giorni dall’inizio del trattamento con l’inquinante, sulle foglie si riscontrava la presenza di piccole (1-2 mm di diametro) aree necrotiche rotondeggianti di colore scuro nella zona internervale della pagina superiore (Figura 44), molto simili a quelle già osservate nelle 48 ore successive all’episodio puntiforme precedentemente riportato (cfr. par. 3.1.1.). Come è possibile notare dalle rette di regressione (Figura 45) le percentuali sia di foglie sintomatiche che di necrosi fogliare risultavano altamente correlate con il tempo di esposizione (con valori di  $R^2$  rispettivamente di 0,69 e 0,85). Al primo tempo di analisi, il tessuto fogliare danneggiato era assai



ridotto (soltanto il 6% dell'area totale) e la percentuale di foglie danneggiate era pari a circa al 2% dell'intero numero di foglie per pianta. Tali valori hanno mostrato un *trend* crescente nelle successive settimane di analisi fino a raggiungere, al termine del trattamento, livelli di area necrotica superiori al 20% sulla singola foglia, con una percentuale di materiale fogliare danneggiato che sfiorava l'8% sul totale dell'intero individuo.



Figura 44 – Lesioni fogliari visibili su foglie di *Melissa officinalis* dopo 14 giorni dall'inizio del trattamento cronico con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup>, per 35 giorni consecutivi). È possibile osservare le piccole necrosi di colore scuro, localizzate nella porzione internervale della pagina superiore (*sinistra*) e della pagina inferiore (*destra*).

Dopo 35 giorni dall'inizio del trattamento, le piante si presentavano sofferenti, con aspetto decisamente meno rigoglioso dei rispettivi controlli (Figura 46). L'esposizione cronica con O<sub>3</sub> determinava un calo significativo (-6% rispetto al materiale mantenuto in aria filtrata) dell'altezza delle piante; analogamente, anche i parametri relativi al peso totale sia fresco che secco mostravano evidenti riduzioni rispetto ai controlli (pari a -11% e -17%, rispettivamente) (Tabella 4). Inoltre, anche l'area fogliare totale ed il numero di foglie subivano un decremento altamente significativo al termine della fumigazione (-34% e -13% rispetto ai controlli). In Figura 47 è riportata la relazione esistente tra numero di foglie per pianta e contenuto in clorofille totali. È evidente come l'andamento di questi due parametri sia fortemente paragonabile nel tempo analizzato, con un forte calo a 35 giorni dall'inizio della fumigazione.

Sulla base dei parametri determinati in maniera diretta, sono stati valutati due indici, quali: (i) SLA, che al termine del trattamento mostrava un leggero decremento seppur non statisticamente significativo e (ii) il *root:shoot ratio*, che, invece, subiva un marcato incremento (+34%).

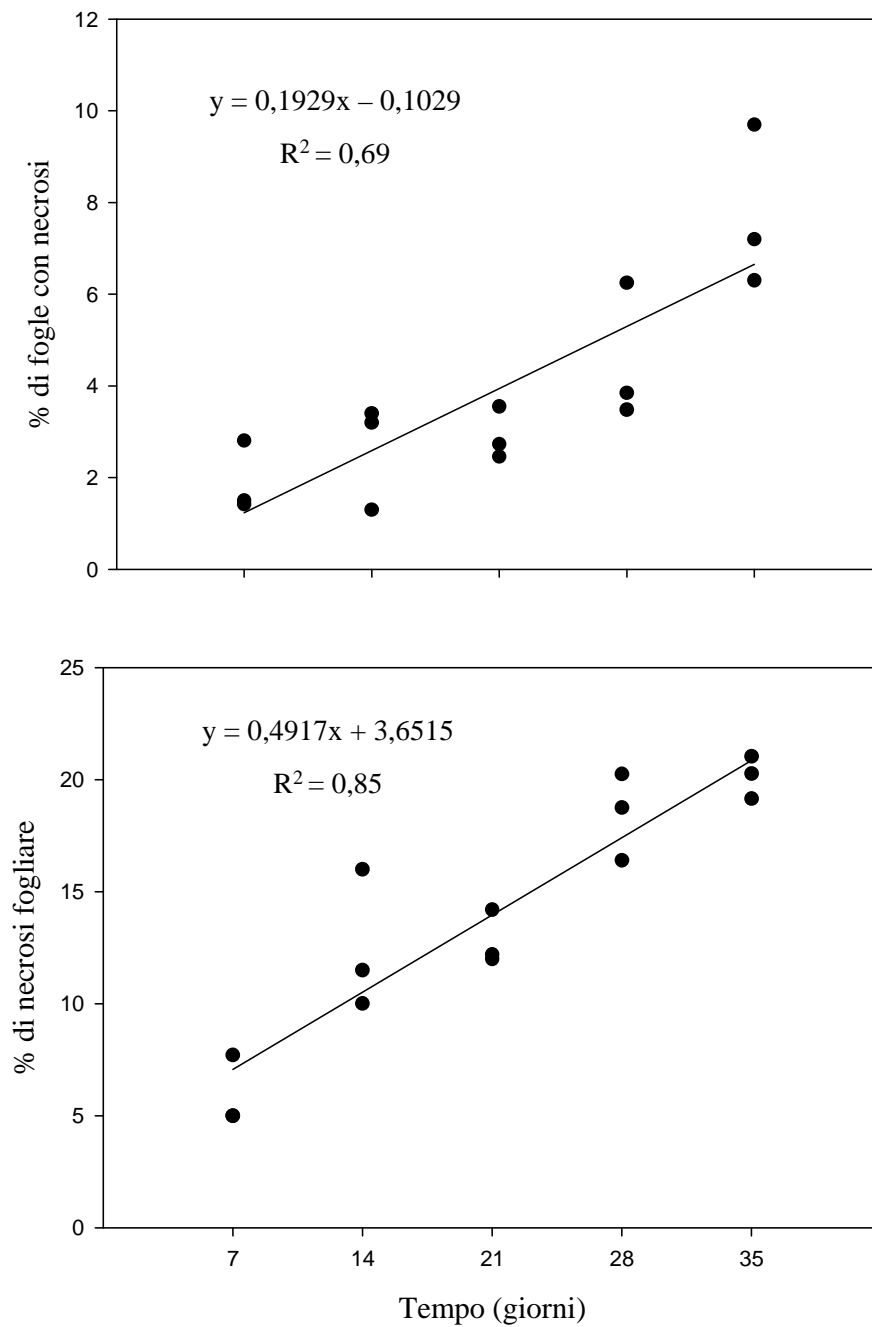


Figura 45 – Correlazione lineare tra percentuale di foglie con presenza di sintomi sul totale (*in alto*) e percentuale di necrosi fogliare (*in basso*) in piante di *Melissa officinalis* sottoposte a trattamento con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi) e analizzate con cadenza settimanale.

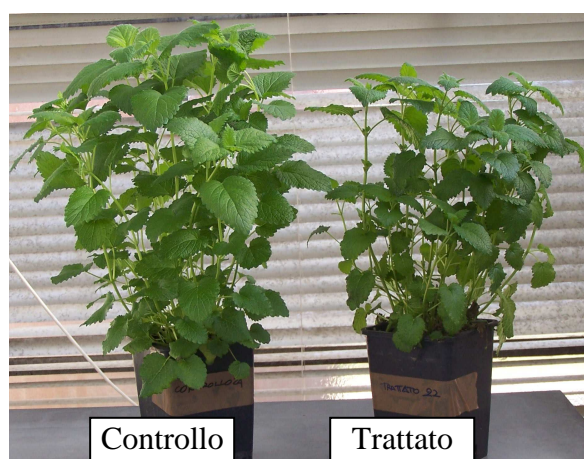


Figura 46 – Piante di *Melissa officinalis* mantenute in aria filtrata (*sinistra*) e sottoposte a fumigazione cronica con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi, *destra*), al termine dell'esposizione.

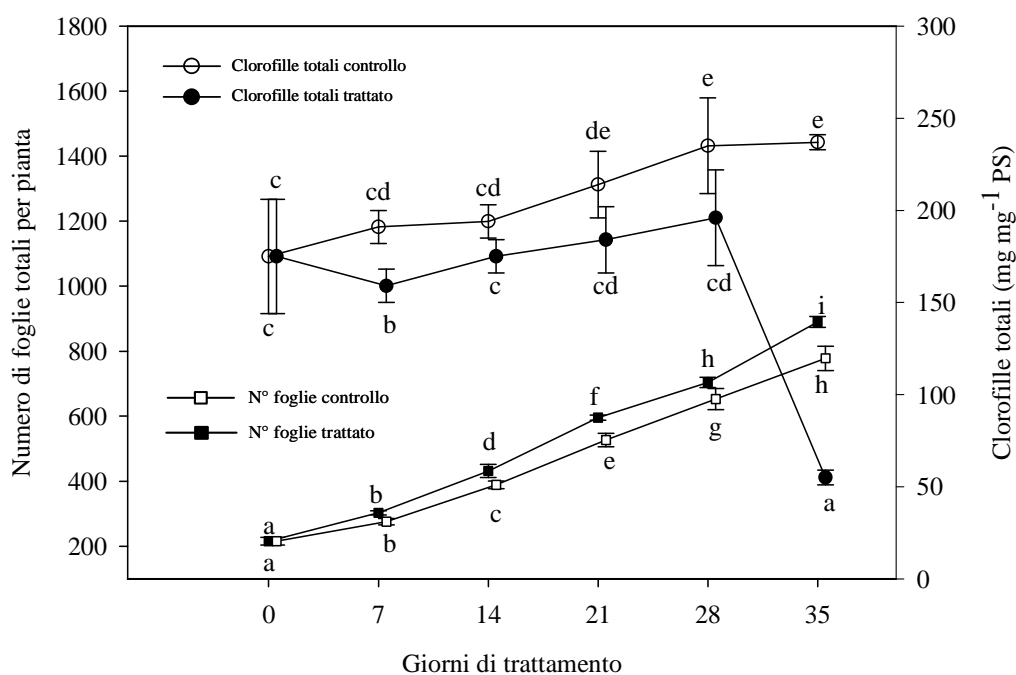


Figura 47 – Andamento temporale del numero di foglie in relazione al contenuto di clorofille totali, analizzato in piante di *Melissa officinalis* di controllo e trattate con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi). I valori, sono riportati come media  $\pm$  deviazione *standard*. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ( $P \leq 0,05$ ) in base ad ANOVA a due vie seguita da *test* LSD.

Tabella 4 – Parametri di crescita analizzati in piante di *Melissa officinalis* sottoposte a fumigazione cronica con ozono (80 ppb, 5 ore d<sup>-1</sup> per 35 giorni consecutivi). I valori sono riportati come media  $\pm$  deviazione *standard*. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative per *Student's t-test*: \*\*\* =  $P \leq 0,001$ ; \*\* =  $P \leq 0,01$ ; \* =  $P \leq 0,05$ ; *ns* =  $P > 0,05$ .

Parametro	Controllo	Ozono	<i>P</i>
Altezza (cm)	39,1 $\pm$ 3,23	36,8 $\pm$ 2,64	*
Peso fresco foglie (g)	39,9 $\pm$ 3,98	36,0 $\pm$ 4,54	*
Peso fresco fusti (g)	41,8 $\pm$ 5,65	37,3 $\pm$ 3,21	*
Peso fresco radici (g)	31,7 $\pm$ 6,12	28,4 $\pm$ 5,81	<i>ns</i>
Peso fresco apicale (g)	81,7 $\pm$ 9,28	73,9 $\pm$ 7,39	*
Peso fresco totale (g)	115,4 $\pm$ 13,06	102,4 $\pm$ 10,26	*
Peso secco foglie (g)	5,2 $\pm$ 0,68	4,3 $\pm$ 0,74	*
Peso secco fusti (g)	4,0 $\pm$ 0,98	3,5 $\pm$ 0,61	<i>ns</i>
Peso secco radici (g)	3,3 $\pm$ 0,84	2,8 $\pm$ 0,67	<i>ns</i>
Peso secco apicale (g)	9,5 $\pm$ 1,73	8,1 $\pm$ 1,21	*
Peso secco totale (g)	13,1 $\pm$ 2,07	10,9 $\pm$ 1,51	**
Lunghezza radici (cm)	34,1 $\pm$ 5,34	33,2 $\pm$ 3,82	<i>ns</i>
Area fogliare totale (cm <sup>2</sup> )	3769 $\pm$ 1037,5	2470 $\pm$ 301,8	***
SLA peso secco apicale	610,6 $\pm$ 73,64	549,1 $\pm$ 55,82	<i>ns</i>
<i>Root:Shoot ratio</i>	0,32 $\pm$ 0,054	0,43 $\pm$ 0,059	**

### 3.2.2. *Discussione esposizione cronica*

La ricerca scientifica riguardante le interazioni tra O<sub>3</sub> e piante, mira a chiarire e definire la risposta biochimica e fisiologica innescata nelle piante dall'O<sub>3</sub> (Pell *et al.*, 1997), anche mediante sperimentazioni di biologia molecolare, volte essenzialmente ad individuare i geni coinvolti, mediante analisi dei livelli dei trascritti e le entità di espressione. E' stato sino ad oggi appurato su varie specie vegetali che, in seguito a trattamenti con l'inquinante, l'espressione dei geni subisce variazioni significative: ad esempio si riporta una riduzione dei livelli dei trascritti connessi alla fotosintesi (Reddy *et al.*, 1993; Bahl e Kahl, 1995) ed un aumento per quelli implicati nell'attivazione dei meccanismi di difesa a patogeni, in particolare di quelli coinvolti nella biosintesi dell'etilene (Schlagnhauser *et al.*, 1995), dei sistemi antiossidanti (Sharma e Davis, 1994), delle proteine legate alla patogenesi [*Pathogenesis Related (PR)-Proteins*] (Ernst *et al.*, 1992; Eckey-Kaltenbach *et al.*, 1994a), della parete cellulare (Galliano *et al.*, 1993; Schneiderbauer *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2008) e, in generale, dei fenilpropanoidi (Eckey-Kaltenbach *et al.*, 1994b; Pasqualini *et al.*, 2003a,b; Francini *et al.*, 2008). E' possibile, pertanto, attribuire all'O<sub>3</sub> un ruolo di elicitore (Sandermann *et al.*, 1998) della risposta difensiva delle piante e, in generale, del metabolismo secondario vegetale. E' in tale prospettiva che, nel corso della seconda fase sperimentale, si è voluto estendere l'indagine al possibile effetto induttore dell'inquinante (i) su basi molecolari, ovvero la trascrizione di alcuni geni codificanti enzimi chiave della via dello scichimato-*pathway*, quali PAL, e della biosintesi dell'acido rosmarinico, 4CL e RAS; (ii) in termini biochimici, sull'attività enzimatica della PAL e sull'entità di produzione di alcuni composti fenolici e flavonoidi

L'analisi molecolare condotta su piante di melissa dopo 7, 14 e 35 giorni dall'inizio del trattamento con O<sub>3</sub> ha rivelato, in effetti, incrementi nei livelli dei trascritti dei tre geni indagati, in particolare dopo la prima settimana. Per quanto concerne la PAL, risultati concordi si trovano in altri lavori scientifici: ad esempio, in cloni di *Centaurea jacea* O<sub>3</sub>-sensibili (Francini *et al.*, 2008), è stato osservato alla fine di un'esposizione acuta all'inquinante (200 ppb, 5 ore) un aumento della trascrizione genica della PAL. Risultano, invece, pochi i riscontri in letteratura relativi al comportamento dei geni 4CL e RAS in presenza di *stress* (Andréa *et al.* 2009; Crifò *et al.*, 2011; Iwai *et al.*, 2010). Ad un incremento del trascritto genico della PAL è corrisposto un aumento ben più marcato dell'attività funzionale dell'enzima, soprattutto a partire dai quattordici giorni successivi dall'inizio del trattamento e, nel contempo, un maggior accumulo di composti fenolici. La PAL è il primo enzima della via biosintetica dei fenilpropanoidi in grado di catalizzare la formazione dell'acido *trans*-cinnamico, attraverso la deamminazione della L-fenilalanina (Schuster

e Retey, 1995; Chen *et al.*, 2006). Esso, collocandosi ad una biforcazione tra metabolismo primario e secondario, rappresenta un passaggio fondamentale nella regolazione della sintesi di numerosi fenoli e composti aromatici (Dixon e Paiva, 1995) e in genere, metaboliti secondari, per molti dei quali è stata da tempo dimostrata un'importante funzione *scavenger* di ROS e di protezione della pianta dal danno fotossidativo (Close e McArthur, 2002). Quanto riportato, quindi, ben si concilia con risultati sinora disponibili in letteratura: esposizioni ad O<sub>3</sub>, e/o ad altri *stress*, sia di natura biotica che abiotica (Wen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006), sono in grado di stimolare l'attività dell'enzima, la sua espressione genica (Paolacci *et al.*, 2001; Guidi *et al.*, 2005; Francini *et al.*, 2008) e la produzione di metaboliti ad esso associati (Ninga *et al.*, 2012). Generalizzando, dunque, episodi puntiformi di O<sub>3</sub> a dosi subacute possono stimolare il metabolismo secondario a più livelli: genico, enzimatico e biosintetico (Guidi *et al.*, 2005). I composti secondari rappresentano elementi essenziali per la caratterizzazione qualitativa delle piante officinali poiché ne costituiscono i cosiddetti “principi attivi” (Raven, 2002). In generale essi, a differenza dei primari, hanno una distribuzione ristretta nel Regno Vegetale e la loro funzione principale è essenzialmente di tipo ecologico, con un significativo ruolo nella difesa e nella competizione (Harborne, 1982; Okigbo *et al.*, 2009). Essi si distinguono in diverse classi chimiche, in funzione della via biosintetica e delle caratteristiche strutturali. La *M. officinalis* è ampiamente utilizzata in ambito culinario e fitoterapico e le sue riconosciute proprietà terapeutiche sono attribuibili soprattutto ai composti biologicamente attivi (fenoli e terpenoidi) presenti in estratti fogliari e oli essenziali. Essa annovera una rilevante componente fenolica consistente in flavonoidi (Dastmalchi *et al.*, 2008), quali flavoni (luteolina ed apigenina) e flavanoni (esperidina ed esperetina) e soprattutto in fenoli semplici quali l'acido rosmarinico (Zgòrka e Głowniak 2001, Petersen e Simmonds, 2003, Ziakova *et al.*, 2003, Dastmalchi *et al.*, 2008). Nel corso della sperimentazione il contenuto di questi composti negli estratti metanolici delle foglie di piante trattate, seppur con livelli e significatività diversi, hanno subito incrementi, in non pochi casi anche notevoli (vedasi l'acido rosmarinico) addirittura sin dalla prima settimana di analisi.

È ben noto che l'attività fitotossica dell'O<sub>3</sub> si esplica anche a carico delle componenti di membrana di cui proteine e lipidi rappresentano sicuramente i bersagli principali, e, a questo livello, l'azione nociva sembrerebbe imputabile alle specie reattive dell'ossigeno in cui l'inquinante rapidamente si degrada nell'apoplasto (Sandermann, 1996; Matysset *et al.*, 2008) e/o ne stimola la produzione. E', infatti, da tempo dimostrato che negli spazi intercellulari del mesofillo la concentrazione di questa molecola sia pressoché nulla (Laisk *et al.*, 1989; Castagna e Ranieri, 2009). Essa, infatti, subisce una rapida decomposizione in prossimità delle pareti e delle membrane

cellulari, generando  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (Tamaoki *et al.*, 2008). Nel corso dell'ultimo decennio numerose sono state le indagini che hanno rivolto l'attenzione allo studio delle ROS prodotte in seguito all'esposizione all' $O_3$  e, in particolare, proprio all'accumulo di  $H_2O_2$ , allo scopo di chiarirne il duplice ruolo di molecola tossica e di intermedio nella trasduzione del segnale di *stress*. Tali ricerche, seppur rivolte soprattutto alla valutazione delle risposte ad esposizioni acute all'inquinante (Langebartels *et al.*, 2002; Iriti *et al.*, 2006), hanno evidenziato una correlazione tra i siti di accumulo dell' $H_2O_2$  e la formazione delle lesioni sulla superficie fogliare (Heath, 2008). A questo proposito, come già appurato nella prima sperimentazione, nelle piante fumigate si è riscontrato un accumulo di  $H_2O_2$ . In particolare, a partire dalla prima settimana di esposizione, i livelli di questo composto hanno subito un notevole incremento, mantenendosi pressoché costanti per l'intero trattamento. Gli alti contenuti di  $H_2O_2$  e, soprattutto, il perdurare degli stessi nel corso di un lungo periodo sperimentale, lascerebbe ipotizzare che la molecola non funga semplicemente da mediatrice di segnale di *stress*, ma rappresenti anche l'esito di un equilibrio perturbato dal potenziale estremamente nocivo (Bouazizi *et al.*, 2010; Hao *et al.*, 2011). Probabilmente proprio a causa di questo accumulo, si è potuto assistere alla comparsa del sintomo, in concomitanza del quale si è anche riscontrato un aumento degli indici di perossidazione lipidica, che hanno lasciato supporre alterazioni a carico dell'assetto molecolare delle unità di membrana (Pellegrini *et al.* 2011a). In passato, ricerche condotte su piante di mais (Pino *et al.*, 1995), pisello, grano e spinacio (Carlsson *et al.*, 1996), pomodoro (Calatayud e Barreno, 2001), orzo (Guerà *et al.*, 2005) e trifoglio esposte ad  $O_3$  (Francini *et al.*, 2007) hanno, comunque, permesso di correlare alti livelli di perossidazione lipidica ad una progressiva disorganizzazione della struttura membranaria (Weber *et al.*, 2004), con conseguente alterazione della sua conformazione (Ranieri *et al.*, 2001b), integrità (Calatayud *et al.*, 2003; Francini *et al.*, 2007), funzionalità (Guidi *et al.*, 2001) e capacità di trasporto (Plazek *et al.*, 2000). La comparsa di un evidente quadro sintomatico, è comunque da considerarsi il risultato di una serie di modificazioni a carico di tutto il metabolismo dell'organismo ed è necessario, comunque, ricordare che il primo segnale di un'incipiente alterazione dei processi di base di una pianta posta in condizioni non ottimali lo si rinviene a livello fotosintetico.

Nelle piante sottoposte a trattamento si è di fatto osservato *in vivo*, mediante analisi della fluorescenza della clorofilla *a* e degli scambi gassosi, una significativa riduzione dell'efficienza fotochimica ottimale del PSII e della fotosintesi (espressi dai parametri  $F_v/F_0$  e  $A_{max}$ , rispettivamente) che, nell'insieme, già forniscono una conferma dell'avvenuta alterazione della funzionalità del mesofillo e addirittura potrebbero lasciar supporre un primario effetto dello *stress* ossidativo sulla fase oscura del processo fotosintetico (Gupta *et al.*, 1991; Reichenauer *et al.*, 1997;

Biswas e Jiang, 2011). La diminuzione dell'attività fotosintetica è stata osservata sin dalla prima settimana di analisi e si è protratta per l'intero periodo di trattamento, in concomitanza ad un graduale calo dei valori di conduttanza stomatica, indicanti una progressiva chiusura degli stomi, che calzerebbe appieno con la “teoria generale di risposta agli *stress*” di Levitt (1980), secondo cui la pianta tenderebbe ad “escludere” fisicamente l'inquinante, opponendosi al suo ingresso. In parallelo, però, i livelli di concentrazione di CO<sub>2</sub> interna e di efficienza d'uso dell'acqua sono rimasti pressoché invariati, analogamente a quanto già osservato da Nali *et al.* (2006) in piante di *M. spicata* esposte a fumigazione cronica. La riduzione simultanea dei livelli di fissazione di CO<sub>2</sub> e G<sub>w</sub> in diverse specie vegetali esposte ad O<sub>3</sub> è stata ben documentata in letteratura (Grantz *et al.*, 2003; Guidi *et al.* 2005; Fiscus *et al.*, 2005; Grulke *et al.*, 2007) e controversa resta la questione se il decremento in A<sub>max</sub> sia effettivamente la conseguenza dei minori valori di G<sub>w</sub> (Degl'Innocenti *et al.* 2003; He *et al.* 2006, Flowers *et al.* 2007). In presenza di livelli di C<sub>i</sub> piuttosto stabili, risulta, però, difficile giustificare una diminuzione di A<sub>max</sub> con una bassa conduttanza stomatica e quindi con un mancato “rifornimento” di CO<sub>2</sub>. In questo caso, probabilmente, la minore entrata del gas è perfettamente compensata da un progressivo suo minor utilizzo nella fase oscura e, quindi, la riduzione della fotosintesi sarebbe da imputare ad altre alterazioni funzionali del mesofillo e/o dei sistemi enzimatici coinvolti (Guidi *et al.*, 2002; Degl'Innocenti *et al.* 2003). A tal proposito, dall'analisi delle curve A/C<sub>i</sub> è emerso che già dopo 7 giorni dall'inizio del trattamento il paramentro V<sub>cmax</sub> subiva una marcata riduzione, evidenziando un possibile danno a carico della RuBisCo (Guidi *et al.*, 2001; Spreitzer e Salvucci, 2002). Una conseguente minore richiesta di ATP e NADPH giustificerebbe, inoltre, anche l'iniziale contrazione osservata nei valori di J<sub>max</sub> (Long e Bertacchi, 2003). E' da rimarcare, del resto, come anche il ritmo di respirazione mitocondriale in presenza di luce ha subito una riduzione già dopo una settimana di esposizione. L'eventuale minore attività di carbossilazione dell'enzima nelle piante trattate non trova comunque un immediato riscontro nelle analisi cromatografiche sul contenuto in zuccheri solubili e amido. Nel corso della sperimentazione, infatti, il livello dei mono- e disaccaridi non variava significativamente e il polisaccaride addirittura aumentava nelle piante trattate, dopo 14 giorni dall'inizio del trattamento, in accordo a quanto osservato da Zheng *et al.* (2000) in piante di *Plantago major* (dopo 28 giorni di fumigazione) e da altri ricercatori in diverse essenze erbacee ed arbustive (Barnes *et al.*, 1990; Schiffgens-Gruber e Lütz, 1992; Günthardt-Goerg *et al.*, 1993; Wellburn e Wellburn, 1994; Balaguer *et al.*, 1995; Barnes *et al.*, 1995; Cernusak *et al.*, 2003; McDowell, 2011). In letteratura, per quanto sia noto che l'O<sub>3</sub> possa interferire con il metabolismo glucidico, divergenti sono ad oggi i risultati delle ricerche condotte su varie specie vegetali (Dizengremel, 2001; Keutgen *et al.* 2005; Keutgen e Pawelzik,



2007; Neufeld *et al.* 2012), circa l'accumulo o l'utilizzo di tali composti dopo un trattamento con l'inquinante. Il meccanismo che porta all'alterazione della distribuzione del carbonio resta ancora oggi poco chiaro. E' possibile che l'O<sub>3</sub> influenzi (i) l'attività di enzimi che regolano la sintesi di saccarosio e amido [ad esempio, fruttosio bisfosfatasi e saccarosio fosfato sintetasi (Huber e Huber, 1992)], (ii) le trasformazioni in zuccheri di altri composti oppure che (iii) agisca a valle, andando quindi a limitare la traslocazione e la ripartizione dei fotosintati nei tessuti di origine (Okano *et al.*, 1984; Spence *et al.*, 1990; Wolfenden e Mansfield, 1991; Wellburn e Wellburn, 1994; Torres Netto *et al.*, 2002). Nel caso in oggetto, del resto, è importante ricordare il decremento nei valori R<sub>d</sub> delle piante trattate, che porterebbe anche in questo contesto ad ipotizzare per gli esosi una sorta di compensazione tra una loro più ridotta biosintesi ed una minore respirazione. Una ridotta attività di carbossilazione e quindi una inferiore richiesta di potere riducente potrebbe giustificare la significativa, seppur modesta, riduzione dei livelli di F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub> registrata in piante trattate e dovuta ad un decremento dei valori di F<sub>m</sub>, piuttosto che ad un aumento della fluorescenza minima. Ne emerge l'ipotesi che l'O<sub>3</sub> possa alterare la funzionalità del PSII quale riduttore dell'accettore primario (Calatayud *et al.*, 2003; Degl'Innocenti *et al.*, 2007) e che, al contrario, secondo la letteratura in merito, non provochi danni ai pigmenti antenna e né induca la formazione di centri di reazione non funzionali (Degl'Innocenti *et al.*, 2003). In realtà nelle piante di melissa ozonate sono state riscontrate modificazioni statisticamente significative a livello del contenuto in pigmenti (quali clorofilla *a* e *b*, xantofille e  $\beta$ -carotene) consistenti in diminuzioni anche rilevanti, soprattutto alla fine del trattamento, che lasciano ipotizzare una riduzione progressiva dei sistemi di captazione dell'energia radiante. L'effetto diretto dell'O<sub>3</sub> sulla degradazione delle clorofilla è ampiamente documentato in letteratura (Heagle *et al.*, 1994; Guidi *et al.*, 2000). E' presumibile, quindi, che vi sia comunque una progressiva attivazione dei processi di distruzione ossidativa di questi pigmenti generalmente impiegati nella detossificazione delle ROS (Pleijel *et al.*, 1998, 2007; Soja *et al.*, 2000), soprattutto dopo 35 giorni di trattamento. Tuttavia, considerando che il rapporto clorofilla *a* e *b* subiva un iniziale decremento, seguito da un incremento al termine del trattamento è anche possibile ipotizzare che l'inquinante abbia indotto una variazione nel numero delle unità fotosinteticamente attive, oltre che un'alterazione nelle dimensioni del sistema antenna, portando cioè ad una modifica quali-quantitativa dei centri di reazione. Molte delle xantofille sono coinvolte in una rapida conversione luce-dipendente, definita appunto ciclo delle xantofille, la cui attivazione sembra essere una risposta a diversi tipi di *stress* (Faria *et al.* 1998; Kronfuß *et al.* 1998; Alonso *et al.* 2001; Reddy *et al.*, 2004; Foyer, 2002). In particolare, le repentine reazioni di questi composti sono necessarie a proteggere i cloroplasti dalla fotodistruzione durante le avverse condizioni

ambientali (Kyparissis, Petropoulou e Manetas 1995; Elvira *et al.* 1998; Alonso *et al.* 1999; Jahns e Holzwarthb, 2012). Per contrastare il danno fotossidativo, l'eossidazione di queste molecole permette, infatti, di dissipare l'energia in eccesso sotto forma di calore (Demming-Adams e Adams, 1996b; Yamamoto e Bassi, 1996; Castagna e Ranieri 2009; Pellegrini *et al.*, 2011a). A conferma di quanto riportato, anche nel nostro studio è possibile riscontrare una stretta correlazione tra %D e indice di deossidazione: entrambi subivano variazioni statisticamente significative, con un iniziale aumento nei primi giorni di trattamento e un ritorno a valori costitutivi nelle settimane successive.

Già dalla prima settimana di trattamento, la capacità antiossidante delle piante fumigate è stata significativamente più alta dei rispettivi controlli, ma solo in termini di unità ORAC. Si ricorda, che i saggi normalmente impiegati sono vari e ciascuno di per sé può produrre esiti differenti, stimando meccanismi diversi. Per esempio, i metodi ORAC e HORAC riflettono due differenti, ma ugualmente importanti, aspetti delle proprietà antiossidanti, quali il contenimento nella formazione di radicali e la rottura di reazioni radicaliche a catena. Il saggio ORAC, in particolare, determina la capacità di assorbimento di radicali perossilici; l'HORAC valuta, invece, l'abilità a prevenire radicali mediante chelazione di metalli (Ou *et al.*, 2002). In letteratura, è a uno di questi meccanismi di azione (o a entrambi) che si attribuisce la capacità antiossidante di alcuni metaboliti secondari. È stato, infatti, notato che composti come genisteina, quercitina e chemferolo rilasciano valori molto alti in termini di unità ORAC, ma del tutto modesti nel caso del saggio HORAC, diversamente dalla rutina che invece mostra valori elevati in entrambi i casi. Al contrario, i più comuni antiossidanti, come Trolox e Vitamina C, non danno valori significativi per l'HORAC e la melatonina sembra avere solo la metà della capacità antiossidante rispetto all'acido gallico (Ou *et al.* 2001). Considerando che anche la resa in oli essenziali (notoriamente ricchi in terpenoidi, Radulovića *et al.*, 2007) è risultata significativamente maggiore in piante fumigate, emerge come esposizioni croniche all'O<sub>3</sub> possano effettivamente stimolare anche in piante di melissa la produzione e/o l'accumulo di metaboliti secondari. Essi rivestirebbero evidentemente, un decisivo ruolo nella difesa contro gli *stress* abiotici, in virtù soprattutto delle loro proprietà antiossidanti e *scavenger* di ROS e radicali liberi, in accordo con quanto riscontrato in numerosi lavori scientifici (Rice-Evans *et al.*, 1997, Williams e Barry., 2004; Edris, 2007).

Oltre alle alterazioni geniche, fisiologiche e biochimiche appena descritte, è importante ricordare che nel complesso, le piante fumigate hanno anche subito limitazioni nella crescita e nella produzione di biomassa. Esistono numerose evidenze sperimentali circa la riduzione di biomassa vegetativa in piante medicinali sottoposte a *stress*: *M. arvensis* (Abou El-Fadl *et al.* 1990b), *Nigella sativa* (Khalid, 2001) sottoposte ad alte concentrazioni saline e *Foeniculum vulgare* (Zaki *et al.*

2009), *Heliantus annuus* (Ahmed e Jabeen, 2009) esposti ad elevata irradianza. Alcuni Autori suggeriscono che questo tipo di risposta potrebbe essere dovuto ad una sorta di adattamento fisiologico e metabolico alla presenza di condizioni avverse e comunque contestuali allo sviluppo della pianta (Maggio *et al.* 2007, 2011).

Tali risultati lasciano supporre come l'O<sub>3</sub> possa in effetti elicitarne una risposta nel metabolismo secondario non solo in termini quantitativi, ma anche qualitativi, stimolando la produzione e/o conversione di specie chimiche a diversa attività biologica. Ne è un esempio l'esito sulle analisi dei composti organici volatili (VOC) emessi dalle foglie di piante trattate e non, al termine dell'esposizione. E' stata osservata un aumento a carico dei monoterpeni ossigenati e dei derivati ossigenati di idrocarburi alifatici. Questi ultimi, definiti *Green Leaf Volatiles* (GLV), sono generalmente considerati tipici prodotti della via delle lipossigenasi (LOX) e per questo rilasciati rapidamente a seguito di un danno meccanico (Takabayashi *et al.*, 1994; Baldwin *et al.*, 2001; 2002), da insetto (Turlings *et al.*, 1998; Kessler e Baldwin, 2001) e abiotico (Pellegrini *et al.*, 2012).

#### 4. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'inquinamento da O<sub>3</sub> è considerato come uno dei più dannosi per la vegetazione e sebbene il fenomeno della sua formazione si realizzi prevalentemente in ambiente urbano, significativi livelli del contaminante sono rinvenibili anche in aree extraurbane, remote e rurali, a seguito del trasporto dei precursori e del contaminante stesso. Il bacino del Mediterraneo, presentando estati calde e secche ed inverni miti, è una regione ad alto rischio per lo *smog* fotochimico, con un tasso di incremento annuo delle concentrazioni di O<sub>3</sub> che si stima attorno allo 0,5-2%. In Italia il livello critico per le colture agrarie è frequentemente superato, spesso con valori 10 volte superiori a tale soglia (Nali *et al.*, 2002).

La *M. officinalis*, appartenente alla famiglia delle *Lamiaceae*, è una pianta erbacea perenne, tipica e originaria del Mediterraneo e dell'Asia occidentale. Nell'uso popolare, viene apprezzata come erba aromatica. Infatti, è considerevolmente utilizzata in cucina, in erboristeria e fitoterapia in virtù delle sue ben note proprietà benefiche.

Ad oggi, in genere, pochi sono i lavori scientifici sugli effetti indotti dall'inquinante troposferico sulle specie officinali e, in particolare, pressoché nulli al riguardo sono gli studi condotti su questa nota e diffusa lamiacea.

La pianta appare discretamente sensibile all'O<sub>3</sub>, a seguito di trattamenti sia puntiformi che cronici. In particolare sono stati riscontrati alcuni evidenti comportamenti differenziali *in vivo* nella risposta stomatica e nella *performance* fotosintetica e variazioni *in vitro*: i) nel contenuto dei relativi pigmenti fotoattivi, correlabili ad una possibile attivazione di meccanismi regolatori (quali il ciclo delle xantofille); ii) nei livelli e tempi di attivazione di alcune molecole segnale (ET, SA, JA e ABA).

Inoltre, le analisi biochimiche sull'integrità delle membrane, primo bersaglio biologico delle ROS nella cellula, hanno dato esito positivo circa una perossidazione lipidica e conseguente alterazione della permeabilità selettiva. Ne emerge che la comparsa dei sintomi fogliari osservati soprattutto al termine del trattamento acuto, e il calo di biomassa nel cronico, possano essere gli effetti macroscopici derivanti da alterazioni fisiologiche e biochimiche subite dalla pianta.

In letteratura molte sono le ricerche volte a verificare le fluttuazioni subite dai metaboliti secondari in piante e in colture cellulari sottoposte a differenti sollecitazioni di tipo fisico, chimico e biochimico, e in generale a *stress* di tipo biotico e abiotico.

In tale prospettiva, attribuendo all'O<sub>3</sub> un ruolo di elicitore (Sandermann *et al.*, 1998) della risposta difensiva delle piante, a cui è spesso associata un'attivazione del metabolismo

secondario, il lavoro si è esteso allo studio della dinamica di produzione di olio essenziale, che negli individui trattati mostrava un aumento della resa, e di alcuni principali composti bioattivi della melissa (*in primis* RA), nonché sui livelli di attività ed espressione di alcuni enzimi coinvolti (PAL, RAS e 4CL).

È stata quindi valutata, mediante saggio ORAC, la capacità antiossidante dell'estratto metanolico fogliare e dell'essenza, su piante trattate che di controllo e in entrambi i casi tale capacità è stata rafforzata dall'azione dell'inquinante.

Alla luce di quanto ottenuto e dimostrato è possibile ipotizzare un possibile impiego dell'O<sub>3</sub> come biostimolante del metabolismo secondario in piante di interesse commerciale, anche in relazione al fatto che :

- non lascia residui
- è efficace anche a basse concentrazioni.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- A.A.V.V. 2003. Metodi per il controllo della qualità delle sostanze ricavate dalle piante medicinali. Società Italiana di Fitoterapia. <http://whqlibdoc.who.int/publications>.
- Able A.J., Guest D.I., Sutherland M.W. 1998. Use of a new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Plant Physiology*: 117, 491-499.
- Abou El-Fadl I.A., Abou-Baker M. e El-Gamal A.M. 1990a. Effect of different organic manure composts on roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) plants and soil characteristics. *Agriculture: Research and Review*: 68, 1077-1087.
- Abou El-Fadl I.A., Abd-Ella M.K., Hussein E.H. 1990b. Effect of irrigation by saline water on the growth and some principal compounds of peppermint and spearmint in two types of soil. *Journal of Agricultural Research Tanta University*: 16, 276-295.
- Acharya B.R. e Assmann S.M. 2009. Hormone interactions in stomatal function. *Plant and Molecular Biology*: 69, 451-62.
- Agrawal S.B., Singh A., Rathore D. 2005. Role of ethylene diurea (EDU) in assessing impact of ozone on *Vigna radiata* L. plants in a suburban area of Allahabad (India). *Chemosphere*: 61, 218-228.
- Ahmed R. e Jabeen N. 2009. Demonstration of growth improvement in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by the use of organic fertilizers under saline conditions. *Pakistan Journal of Botany*: 41, 1373-1384.
- Ali S.S., Kasoju N., Luthra A., Singh A., Sharanabasava H., Sahu A. e Bora U. 2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*: 41, 1-15.
- Alonso R., Elvira S., Castillo F.J., B.S. 2001. Interactive effect of ozone and drought stress on pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinis halpensis*. *Plant Cell Environmental*: 2, 905-916.
- Allothman M., Kaur B., Fazilah A., Bhat R., Karim A.A. 2010. Ozone-induced changes of antioxidant capacity of fresh-cut tropical fruits. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*: 11, 666-671.
- Anderson R.G., Donahue J.L., Cramer C.L. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiologia Plantarum*: 100, 224-233.
- Andréa C.M., Schafleitner R., Legaya S., Lefèvre I., Alvarado Aliaga C.A., Nomberto G., Hoffmann L., Hausman J.F., Larondelle Y., Eversa D. 2009. Gene expression changes

- related to the production of phenolic compounds in potato tubers grown under drought stress. *Phytochemistry*: 70, 1107-1116.
- Antonielli M., Pasqualini S., Ederli L., Batini P., Moscatello S., Loreto F. 1997. Physiological characteristics of tobacco cultivars with contrasting sensitivity to ozone. *Environmental and Experimental Botany*: 38, 271-277.
- Baczek-Kwinta R. 2002. Differential response to elevated ozone of various herbs. *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych*: 481, 423-430.
- Bahl A. e Kahl G. 1995. Air pollutant stress changes the steady-state transcript levels of three photosynthesis genes. *Environmental Pollution*: 88, 57-65.
- Baier M., Kandlbinder A., Golldack D. e Dietz, K. 2005. Oxidative stress and ozone: perception, signalling and response. *Plant, Cell and Environmental*: 28, 1012-1020.
- Baldwin J.C., Karthikeyan A.S. e Raghothama K.G. 2001. LePS2, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato. *Plant Physiology*: 125, 728-737.
- Baldwin I.T., Kessler A., Halitschke R. 2002. Volatile signaling in plant-plant-herbivore interactions: what is real? *Current Opinion on Plant Biology*: 5, 351-354.
- Balaguer L., Barnes J.D., Panicucci A., Borland A.M. 1995. Production and utilisation of assimilates in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves exposed to elevated O<sub>3</sub> and/or CO<sub>2</sub>. *New Phytologist*: 129, 557-568.
- Barnes J.D., Verlissariou D., Davison A.W., Holevas C.D. 1990. Comparative ozone sensitivity of old and modern Greek cultivars of spring wheat. *New Phytologist*: 116, 707-714.
- Barnes J.D., Ollerenshaw J.H., Whitfield C.P. 1995. Effects of elevated CO<sub>2</sub> and/or O<sub>3</sub> on growth, development and physiology of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Global Change Biology*: 1, 129-142.
- Barrs H.D. e Weatherby P.E. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Science*: 15, 413-428.
- Bauer R. e Franz G. 2010. Modern European monographs for quality control of Chinese herbs. *Planta Medicine*: 76, 2004-11.
- Beckerson D.W. e Hofstra G. 1980. Effects of sulphur dioxide and ozone, singly or in combination, on membrane permeability. *Canadian Journal of Botany*: 58, 451-457.
- Berger A., Meinhard J., Petersen M. 2006. Rosmarinic acid synthase is a new member of the superfamily of BAHD acyltransferases. *Planta*: 224, 1503-1510.

- Bettaie I., Zakhama N., Wannes A.W., Kchouk M.E., Marzouk B. 2009. Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. *Scientia Horticulturae*: 120, 271-275.
- Biagioni M., Nali C., Heimler D., Lorenzini G. 1997. PAL activity and differential ozone sensitivity in tobacco, bean and poplar. *Journal of Phytopathology*: 145, 533-539.
- Biswas D.K. e Jiang G.M. 2011. Differential drought-induced modulation of ozone tolerance in winter wheat species. *Journal of Experimental Botany*: 62, 4153-4162.
- Blum O. e Didyk N. 2007. Study of ambient ozone phytotoxicity in Ukraine and ozone protective effect of some antioxidants. *Journal of Hazard Materials*: 149, 598-602.
- Bolhàr-Nordenkamp H.R., Long S.P., Baker N.R., Öquist G., Schreiber U., Lechner E.G. 1989. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: A review of current instrumentation. *Functional Ecology*: 3, 497-514.
- Bolis M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*: 181, 1199-1200.
- Bors W., Langebartels C., Michel C., Sandermann H. 1989. Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochemistry*: 28, 1589-1595.
- Bouazizi H., Jouili H., Geitmann A., El Ferjani E. 2010. Copper toxicity in expanding leaves of *Phaseolus vulgaris* L.: antioxidant enzyme response and nutrient element uptake. *Ecotoxicology and Environmental Safety*: 73, 1304-1308.
- Boudet A.M. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*: 68, 2722-2735.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*: 72, 248-254.
- Brendley B. e Pell E. 1998. Ozone-induced changes in biosynthesis of RuBisCO and associated compensation to stress in foliage hybrid poplar. *Tree physiology*: 18, 81-90.
- Bruni A. 1999. *Farmacognosia generale e applicata*. Ed Piccin, Padova: 419 pp.
- Bussotti F., Gravano E., Grossoni P., Tani C., Mori B. 2003a. Ultrastructural response of a Mediterranean shrub species to O<sub>3</sub>. *Developments in Environmental Science*: 3, 259-268.
- Bussotti F., Schaub M., Cozzi A., Kräuchi N., Ferretti M., Novak K., Skelly J.M. 2003b. Assessment of ozone visible symptoms in the field: perspectives of quality control. *Environmental Pollution*: 125, 81-89.



- Bussotti F. e Ferretti M. 2009. Visible injury, crown condition, and growth responses of selected Italian forests in relation to ozone exposure. *Environmental Pollution*: 157, 1427-1437.
- Calatayud A. e Barreno E. 2001. Chlorophyll *a* fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in tomato in response to ozone and benomyl. *Environmental Pollution*: 115, 283-289.
- Calatayud A. e Barreno E. 2004. Response to ozone in two lettuce varieties on chlorophyll *a* fluorescence, photosynthetic pigments and lipid peroxidation. *Plant Physiology and Biochemistry*: 42, 549-555.
- Calatayud A., Iglesias D.J., Talón M., Barreno E. 2003. Effects of 2-month ozone exposure in spinach leaves on photosynthesis, antioxidant systems and lipid peroxidation. *Plant Physiology and Biochemistry*: 41, 839-845.
- Carlsson A.S., Wallin G., Sandelius A.S. 1996 Species and age-dependent sensitivity to ozone in young plants of pea, wheat and spinach: effects on acyl lipid and pigment content and metabolism. *Physiologia Plantarum*: 98, 271-280.
- Castagna A., Nali C., Ciompi S., Lorenzini G., Soldatini G. F., Ranieri, A. 2001. Ozone exposure affects photosynthesis of pumpkin. *New Phytologist*: 152, 223-229.
- Castagna A. e Ranieri A. 2009. Detoxification and repair process of ozone injury: From O<sub>3</sub> uptake to gene expression adjustment. *Environmental Pollution*: 157, 1461-1469.
- Cernusak L.A., Arthur D.J., Pate J.S., Farquhar G.D. 2003. Water relations link carbon and oxygen isotope discrimination to phloem sap sugar concentration in *Eucalyptus globulus*. *Plant Physiology*: 131, 1544-1554.
- Chameides W.L. 1989. The chemistry of ozone deposition to plant leaves: role of ascorbic acid. *Environmental Science Technology*: 23, 595-600.
- Chameides W.L., Kasibhatla P.S., Yienger Je., Levy H. 1994. Growth of continental scale metro-agro-plexes, regional ozone pollution, and world food production. *Science*: 264, 74-77.
- Chen J.Y., Wen P.F., Kong W.F., Pan Q.H., Zhan J.C., Li J.M., Wan S.B., Huang W.D. 2006. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biology and Technology*: 40, 64-72.
- Cheng G.W. e Breen P.J. 1991. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*: 116, 865-869.

- Ciampi S., Castagna A., Ranieri A., Nali C., Lorenzini G., Soldatini G.F. 1997. CO<sub>2</sub> assimilation, xanthophyll cycle pigments and PSII efficiency in pumpkin plants as affected by ozone fumigation. *Physiologia Plantarum*: 101, 881-889.
- Close D.C. e McArthur C. 2002. Rethinking the role of many plant phenolics – protection from photodamage not herbivores? *Oikos*: 99, 166-172.
- Colbeck I. e MacKenzie A.R. 1994. Air pollution by photochemical oxidants. Elsevier, London, 376 pp.
- Conklin P.L., Pallanca J.E., Last R.L., Smirnoff N. 1997. L-ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant. *Plant Physiology*: 115, 1277-1285.
- Conklin P.L. e Barth C. 2004. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and onset of senescence. *Plant, Cell and Environment*: 27, 959-970.
- Creelmann R.A. e Mullet J.E. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 4114-4119.
- Creelmann R.A. e Mullet J.E. 1997. Biosynthesis and actions of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology, Plant Molecular Biology*: 48, 355-381.
- Crifò T., Puglisia I., Petronea G., Recupero G.R., Lo Piero A.R. 2011. Expression analysis in response to low temperature stress in blood oranges: Implication of the flavonoid biosynthetic pathway. *Gene*: 476, 1-9.
- Crutzen P.J. 1973. A discussion of the chemistry of some minor constituents in the stratosphere and troposphere. *Pure and Applied Geophysics*: 108, 1385-1399.
- Crutzen P.J. 1974. Photochemical reactions initiated by and influencing ozone in unpolluted tropospheric air. *Tellus*: 16, 47-56.
- D'Haese D., Vandermeiren K., Caubergs R.J., Guisez Y., De Temmerman L., Horemans N. 2004. Non-photochemical quenching kinetics during the dark to light transition in relation to the formation of antheraxanthin and zeaxanthin. *Journal of Theoretical Biology*: 227, 175-186.
- D'Haese D., Vandermeiren K., Asard H., Horemans N. 2005. Other factors than apoplastic ascorbate contribute to the differential ozone tolerance of two clones of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment*: 28, 623-632.
- Dastmalchi K., Damien Dorman H.J., Oinonen Päivi P., Yusrda D., Laakso I., Hiltunen R. 2008. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT - Food Science and Technology*: 41, 391-400.

- Davies N.W. 1990. Gas Chromatographic retention indexes of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography*: 503, 1-24.
- Davies K.J.A. 2001. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*: 50, 279-289.
- Davis J.M., Wu M., Cooke J.E., Reed J.M., Luce K.S., Michler C.H. 2002. Pathogen challenge, salicylic acid and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologs in pine. *Molecular Plant-Microbe Interactions*: 15, 380-387.
- Dawney L. e Mills G. 2009. Relative effects of elevated background ozone concentrations and peak episodes on senescence and above-ground growth in four populations of *Anthoxanthum odoratum* L. *Environmental Pollution*: 157, 503-510.
- De las Rivas J., Abadía A., Abadía J. 1989. A new reversed phase-HPLC method resolving all major higher plant photosynthetic pigments. *Plant Physiology*: 91, 190-192.
- De Pasquale R., Rapisarda A., Germano M. P., Ragusa S., Kirjavainen S. e Galati E. M. 1995. Effects of cadmium on growth and pharmacologically active constituents of the medicinal plant *Coriandrum sativum* L. *Water Air and Soil Pollution*: 84, 147-157.
- Degl'Innocenti E., Vaccà C., Guidi L., Soldatini G.F. 2003. CO<sub>2</sub> photoassimilation and chlorophyll fluorescence in two clover species showing different response to O<sub>3</sub>. *Plant Physiology and Biochemistry*: 41, 485-493.
- Degl'Innocenti E., Guidi L., Soldatini G.F. 2007. Effects of elevated ozone on chlorophyll a fluorescence in symptomatic and asymptomatic leaves of two tomato genotypes. *Biologia Plantarum*: 51, 313-321.
- Demmig-Adams B. e Adams W.W. 1996a. Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta*: 198, 460-470.
- Demmig-Adams B. e Adams W.W. 1996b. The role of the xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*: 1, 21-26.
- Di Baccio D., Navarri-Izzo F., Izzo R. 2004. Seawater irrigation antioxidant defence responses in leaves and roots of a sunflower (*Helianthus annuus* L.) ecotype. *Journal of Plant Physiology*: 161, 1359-1366.
- Di Baccio D., Castagna A., Paoletti A., Sebastiani L., Ranieri A. 2008. Could the differences in O<sub>3</sub> sensitivity between two poplar clones be related to a difference in antioxidant defense and secondary metabolic response to O<sub>3</sub> influx? *Tree Physiology*: 28, 1761-1772.

- Di Baccio D., Ederli L., Marabottini R., Badiani M., Francini A., Nali C., Antonelli M., Santangelo E., Sebastiani L., Pasqualini S. 2012. Similar foliar lesions but opposite hormonal patterns in a tomato mutant impaired in ethylene perception and its near isogenic wild type challenged with ozone. *Environmental and Experimental Botany*: 75, 286-297.
- Diara C., Castagna A., Baldan B., Mensuali-Sodi A., Sahr T., Langebartels C., Sebastiani L., Ranieri A. 2005. Differences in the kinetics and scale of signalling molecule production modulate the ozone sensitivity of hybrid poplar clones: the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ethylene and salicylic acid. *New Phytologist*: 168, 351-364.
- Dixon R.A. e Paiva N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*: 7, 1085-1097.
- Dizengremel P., Sasek T.W., Brown K.J., Richardson C.J. 1994. Ozone-induced changes in primary carbon metabolism enzymes of loblolly-pine needles. *Journal of Plant Physiology*: 144, 300-306.
- Dong X. 1998. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plant. *Current Opinion in Plant Biology*: 1, 316-323.
- Eckey-Kaltenbach H.E., Grosskopf E., Sandermann H., Ernst D. 1994a. Induction of pathogen defence genes in parsley (*Petroselinum crispum* L.) plants by ozone. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*: 102, 63-74.
- Eckey-Kaltenbach H.E., Ernst D., Heller H., Sandermann H. 1994b. Biochemical plant responses to ozone. IV. Cross-induction of defensive pathways in parsley (*Petroselinum crispum* L.) plants. *Plant Physiology*: 104, 67-74.
- Eckey-Kaltenbach H., Kiefer E., Grosskopf E., Ernst D., Sandermann H. 1997. Differential transcript induction of parsley pathogenesis-related proteins and of a small heat shock protein by ozone and heat shock. *Plant Molecular Biology*: 33, 343-350.
- Edris A.E. 2007. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytotherapy Research*: 21, 308-323.
- El-Khatib A.A. 2003. The response of some common Egyptian plants to ozone and their use as biomonitors. *Environmental Pollution*: 124, 419-428.
- El-Safhy S., Meawad A., Awad A., Shaer M. 1991. Effect of combination treatment between salinity, gamma irradiation as well as cycocyl on II leaf pigment and chemical constituent of sweet basil plants. *Zagazig Journal of Agricultural Research*: 18, 2247-2293.

- Elvira S., Alonso R., Castillo F., Gimeno B.S. 1998. On the response of pigments and antioxidants of *Pinus halepensis* seedlings to Mediterranean climatic factors and long-term ozone exposure. *New Phytologist*: 138, 419-432.
- Ernst D., Schraudner M., Langebartels C., Sandermann H. 1992. Ozone-induced changes of mRNA levels of  $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase and “pathogenesis-related” protein 1b in tobacco plants. *Plant Molecular Biology*: 20, 673-682.
- Fam S.S. e Morrow J.D. 2003. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation-a review. *Current Medicinal Chemistry*: 10, 1723-1740.
- Farage P.K. e Long S.P. 1999. The effects of O<sub>3</sub> fumigation during leaf development on photosynthesis of wheat and pea: an *in vivo* analysis. *Photosynthetic Research*: 59, 1-7.
- Faraloni C., Cutino I., Petruccelli R., Leva A.R., Lazzeri S., Torzillo G. 2011. Chlorophyll fluorescence technique as a rapid tool for *in vitro* screening of olive cultivars (*Olea europaea* L.) tolerant to drought stress. *Environmental and Experimental Botany*: 73, 49-56.
- Faria T., Silvério D., Breia E., Cabral R., Abadía A., Abadía J., Pereira J.S. e Chaves M.M. 1998. Differences in the response of carbon assimilation to summer stress (water deficits, high light and temperature) in four Mediterranean tree species. *Physiologia Plantarum*: 102, 419-428.
- Farooqi Z.R., Zafar Iqbal M., Kabir M. e Shafiq M. 2009. Toxic effect of lead and Cadmium on germination and seedling growth of *Albizia lebbek* L. *Benth Pakistan Journal of Botany*: 9, 29-36.
- Fecka I. e Turek S. 2007. Determination of water soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from *Lamiaceae*: Peppermint, melissa, and sage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*: 55, 1908-1917.
- Fiscus E.L., Booker F.L., Burkey K.O. 2005. Crop responses to ozone: uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning. *Plant, Cell and Environment*: 28, 997-1011.
- Fishman J., Vukovich F.M., Browell E.V. 1985. The photochemistry of synoptic-scale ozone synthesis: implications for the global ozone budget. *Journal of Atmospheric Chemistry*: 3, 299-320.
- Flowers M.D., Fiscus E.L., Burkey K.O., Booker F.L., Dubois J.J. 2007. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and yield of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes differing in sensitivity to ozone. *Environmental and Experimental botany*: 61, 190-198.

- Foyer C.H. 2002. The contribution of photosynthetic oxygen metabolism to oxidative stress in plants. D. Inze, M.V. Montago (Eds.), *Oxidative Stress in Plants*, Taylor and Francis Publishers, New York, USA: 33-68.
- Foyer C.H. e Noctor G. 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*: 119, 355-364.
- Francini A., Nali C., Picchi V., Lorenzini G. 2007. Metabolic changes in white clover clones exposed to ozone. *Environmental and Experimental Botany*: 60, 11-19.
- Francini A., Nali C., Pellegrini E., Lorenzini G. 2008. Characterization and isolation of some genes of the shikimate pathway in sensitive and resistant *Centaurea jacea* plants after ozone exposure. *Environmental Pollution*: 151, 272-279.
- Frankel E.N. e Meyer A.S. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*: 80, 1925-1941.
- Galliano H., Cabanè M., Eckerson C., Lottspeich F., Sandermann H., Ernst D. 1993. Molecular cloning, sequence analysis and elicitor-/ozone-induced accumulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase from Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Molecular Biology*: 23, 145-156.
- Gaucher C., Costanzo N., Dany A., Mauffete Y., Chevrier N., Dizengremel P. 2003. The impact of elevated ozone and carbon dioxide on young *Acer saccharum* seedlings. *Physiologia Plantarum*: 117, 392-402.
- Gerosa G., Marzuoli R., Desotgiu R., Bussotti F., Ballarin-Denti A. 2009. Validation of the stomatal flux approach for the assessment of ozone visible injury in young forest trees. Results from the TOP (transboundary ozone pollution) experiment at Curno, Italy. *Environmental Pollution*: 157, 1497-1505.
- Gill S.S. e Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*: 48, 909-930.
- Giuliano G., Bartley G.E., Scolnik P.A. 1993. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell*: 5, 379-387.
- Glick R.E., Schlagnhauser C.D., Arteca R.N., Pell E. 1995. Ozone-induced ethylene emission accelerates the loss of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylate/oxygenase and nuclear-encoded mRNAs in senescing potato leaves. *Plant Physiology*: 109, 891-898.
- Goumenakia E., Taybia T., Borlanda A., Barnes J. 2010. Mechanisms underlying the impacts of ozone on photosynthetic performance. *Environmental and Experimental Botany*: 69, 259-266.

- Govindaraghavan S., Hennell J.R., Sucher N.J. 2012. From classical taxonomy to genome and metabolome: Towards comprehensive quality standards for medicinal herb raw materials and extracts. *Fitoterapia*: 83, 979-988.
- Grantz D.A., Silva V., Toyota M., Ott N. 2003. Ozone increases root respiration but decreases leaf CO<sub>2</sub> assimilation in cotton and melon. *Journal of Experimental Botany*: 54, 2375-2384.
- Gravano E., Giulietti V., Desotgiu R., Bussotti F., Grossoni P., Gerosa G., Tani C. 2003. Foliar response of an *Ailanthus altissima* clone in two sites with different levels of ozone-pollution. *Environmental Pollution*: 121, 137-146.
- Grulke N.E., Neufeld H.S., Davison A.W., Roberts M., Chappelka A.H. 2007. Stomatal behavior of ozone-sensitive and -tolerant coneflowers (*Rudbeckia laciniata* var. *digitata*) in Great Smoky Mountains National Park. *New Phytologist*: 173, 100-109.
- Guderian R. 1985. Air pollution by photochemical oxidant. Formation, transport, control and effects on plants (R. Guderian Ed.). *Ecological Studies*, Springer, Berlin: vol. 52.
- Guéra A., Calatayud A., Sabater B., Barreno E. 2005. Involvement of the thylakoidal NADH-plastoquinone-oxidoreductase complex in the early responses to ozone exposure of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany*: 56, 205-218.
- Guerra J.C., Rodríguez S., Arencibia MT., García M.D. 2004. Study on the formation of ozone in relation to the air quality management and vegetation protection in Tenerife (Canary Islands). *Chemosphere*: 56, 1157-1167.
- Guidi L., Di Cagno R., Soldatini G.F. 2000. Screening of bean cultivars for their response to ozone as evaluated by visible symptoms and leaf chlorophyll fluorescence. *Environmental Pollution*: 107, 349-355.
- Guidi L., Nali C., Lorenzini G., Filippi F., Soldatini G.F. 2001. Effect of chronic ozone fumigation on the photosynthetic process of poplar clones showing different sensitivity. *Environmental Pollution*: 113, 245-254.
- Guidi L., Degl'Innocenti E., Soldatini G.F. 2002. Assimilation of CO<sub>2</sub>, enzyme activation and photosynthetic electron transport in bean leaves, as affected by high light and ozone. *New Phytologist*: 156, 377-388.
- Guidi L., Degl'Innocenti E., Genovesi S., Soldatini G.F. 2005. Photosynthetic process and activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in resistant and sensitive genotypes of *Lycopersicon esculentum* L. exposed to ozone. *Plant Science*: 168, 153-160.

- Günthardt-Goerg M.S., Keller T., Matyssek R., Scheidegger C. 1993. Differentiation and structural decline in the leaves and bark of birch (*Betula pendula*) under low ozone concentrations. *Trees*: 7, 104-114.
- Gupta A.S., Alscher R.G., McCune D. 1991. Response of photosynthesis and cellular antioxidants to ozone in *Populus* leaves. *Plant Physiology*: 96, 650-655.
- Haagen-Smith A.J., Darley E.F., Zaitlin M., Noble W. 1952. Investigation on injury to plants from pollution in the Los Angeles area. *Plant Physiology*: 27, 18-23.
- Hafidh R.R., Abas F., Abdulamir A.S., Jahanshiri F., Abu Bakar F. e Sekawi. Z. 2009. A review: cancer research of natural products in Asia. *International Journal of Cancer Research*: 5, 69-82.
- Halliwell B. e Gutteridge J.M.C. 1989. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford. Second Edition.
- Hao X., Yu K., Ma Q., Song X., Li H., Wang M. 2011. Histochemical studies on the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hypersensitive cell death in the nonhost resistance of pepper against *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*: 76, 104-111.
- Harborne J.B. 1982. Introduction to ecological biochemistry. 2nd. Ed. Academic Press. New York: 318 pp.
- Havaux M., Bonfils J.P., Lütz C., Niyogi K.K. 2000. Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the npq1 *Arabidopsis* mutant deficient in the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin deepoxidase. *Plant Physiology*: 124, 273-284.
- He X.Y., Ruan Y.N., Chen W., Lu T. 2006. Responses of the anti-oxidative system in leaves of *Ginkgo biloba* to elevated ozone concentration in an urban area. *Botanic Studies*: 47, 409-416.
- Heagle A.S., Miller J.E., Sherril D.E. 1994. A white clover system to estimate effects of tropospheric ozone on plants. *Journal of Environmental Quality*: 23, 613-621.
- Heath R.L. 1987. The biochemistry of ozone attack on the plasma membrane of plant cells. *Recent Advances in Phytochemistry*: 21, 29-54.
- Heath R.L. 1994. Alterations of plant metabolism by ozone exposure. In: (Alscher RG, Wellburn AR. Eds.) *Plant responses to the gaseous environment*. London, UK: Chapman & Hall: 121-145.
- Heath R.L. 2008. Modification of the biochemical pathways of plants induced by ozone: what are the varied routes to change? *Environmental Pollution*: 155, 453-463.



- Hendawy S.F. e Khalid K.A. 2005. Response of sage (*Salvia officinalis* L.) plants to zinc application under different salinity levels. *Journal of Applied Science Research*: 1, 147-155.
- Herbinger K., Tausz M., Wonisch A., Soja G., Sorger A., Grill D. 2002. Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defence systems of two wheat cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*: 40, 691-696.
- Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K. 1999. Improving the thiobarbituric acid reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*: 207, 604-611.
- Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A. e Prior R.L. 2002. Highthroughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 50, 4437-4444.
- Huber S.C. e Huber J.L. 1992. Role of Sucrose-Phosphate Synthase in Sucrose Metabolism in Leaves. *Plant Physiology*: 99, 1275-1278.
- Innes J.L., Skelly J.M., Schaub M. 2001. Ozone and broadleaved species: a guide to the identification of ozone induced foliar injury. Birmensdorf, Eidgenössische Forschungsanstalt WSL, Haupt, Bern, Stuttgart, Wien: 136.
- Iriti M., Rabotti G., De Ascensao A., Faoro F. 2003. Benthiazazole-induced resistance modulates ozone tolerance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 51, 4308-4314.
- Iriti M., Belli L., Nali C., Lorenzini G., Gerosa G., Faoro F. 2006. Ozone sensitivity of currant tomato (*Lycopersicon pimpinellifolium*), a potential bioindicator species. *Environmental Pollution*: 141, 275-282.
- Iriti M. e Faoro F. 2008. Oxidative stress, the paradigm of ozone toxicity in plants and animals. *Water, Air and Soil Pollution*: 187, 185-301.
- Ishida H., Makino A., Mae T. 1999. Fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by reactive oxygen species occurs near Gly-329. *Journal of Biological Chemistry*: 274, 5222-5226.
- Iwai M., Ohta M., Tsuchiya H., Suzuki T. 2010. Enhanced accumulation of caffeic acid, rosmarinic acid and luteolin-glucoside in red perilla cultivated under red diode laser and blue LED illumination followed by UV-A irradiation. *Journal of Functional Foods*: 2, 66-70.

- Jahns P. e Holzwarthb A.R. 2012. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*: 1817, 182-193.
- Joo J.H., Wang S., Chen J.G., Jones A.M., Fedoroff N. 2005. Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in the *Arabidopsis* oxidative stress response to ozone. *The Plant Cell*: 17, 957-970.
- Junge C.E. 1962. Global ozone budget and exchange between stratosphere and troposphere. *Tellus*: 14, 363-377.
- Junqua M., Biolley J.P., Pie S., Kanoun M., Duran R., Goulas P. 2000. *In vivo* occurrence of carbonyl residues in *Phaseolus vulgaris* proteins as a direct consequence of a chronic ozone stress. *Plant Physiology and Biochemistry*: 38, 853-861.
- Kambizi L., Adebola P.O., Afolayan. A.J. 2006. Effects of temperature, pre-chilling and light on seed germination of *Withania somnifera*; a high value medicinal plant *South African Journal of Botany*: 72, 11-14.
- Kaňa R. e Vass I. 2008. Thermoimaging as a tool for studying light-induced heating of leaves: Correlation of heat dissipation with the efficiency of photosystem II photochemistry and non-photochemical quenching. *Environmental and Experimental Botany*: 64, 90-96.
- Kangasjärvi J., Talvinen J., Utriainen M., Karjalainen R. 1994. Plant defence systems induced by ozone. *Plant, Cell and Environment*: 17, 783-794.
- Kangasjärvi J., Jaspers P., Kollist H. 2005. Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant, Cell and Environment*: 28, 1021-1036.
- Kanna M., Tamaoki M., Kubo A., Nakajima N., Rakwal R., Agrawal GK., Tamogami S., Ioki M., Ogawa D., Saji H., Aono M. 2003. Isolation of an ozone-sensitive and jasmonate semi-insensitive *Arabidopsis* mutant (oji1). *Plant Cell Physiology*: 44, 1301-1310.
- Kanofsky G. e Sima H. 1995. Singlet oxygen generation from the reaction of O<sub>3</sub> with plant leaves. *Journal of Biological Chemistry*: 270, 7850-7852.
- Kelly F.J. e Mudway I.S. 2003. Protein oxidation at the air lung interface. *Amino Acids*: 25, 375-396.
- Kessler A. e Baldwin I.T. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*: 291, 2141-2144
- Keutgen A.J., Noga G., Pawelzik E. 2005. Cultivar-specific impairment of strawberry growth, photosynthesis, carbohydrate and nitrogen accumulation by ozone. *Environmental and Experimental Botany*: 53, 271-280.

- Keutgen, A.J. e Pawelzik, E., 2007. Modifications of taste-relevant compounds in strawberry fruit under NaCl salinity. *Food Chemistry*: 105, 1487-1494.
- Kevers C. e Gaspar T. 1985. Soluble, membrane and wall peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase and lignin changes in relation to vitrification of carnation tissues cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*: 118, 41-48.
- Khalid K.A. 2001. Physiological studies on the growth, development and chemical composition of *Nigella sativa* L. plant. PhD Thesis, Faculty of Agriculture, Ain-Shams University of Cairo, Egypt: 214-218.
- Khalil M.Y., Moustafa A.A. e Naguid N.Y. 2007. Growth, phenolic compound and antioxidant activity of some medicinal plants grown under organic farming condition. *World Journal of Agricultural Sciences*: 3, 451-57.
- Khatun S., Babar A.M., Hahn E.J., Paek K.Y. 2008. Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants. *Environmental and Experimental Botany*: 64, 279-285.
- Kley D., Kleinmann M., Sandermann H., Krupa S. 1999. Photochemical oxidant: state of the science. *Environmental Pollution*: 100, 19-42.
- Kobriger N.P. 1984. Source and migration of highway runoff pollutants. Federal Highway Administration report FHWA/RD-84/057, Washington DC.
- Kollist H., Moldau H., Mortensen L., Rasmussen S.K., Jorgensen L.B. 2000. Ozone flux to plasmalemma in barley and wheat is controlled by stomata rather than by direct reaction of ozone with cell wall ascorbate. *Journal of Plant Physiology*: 156, 645-651.
- Kouvarakis G.K., Tsigaridis M., Kanakidou e Mihalopoulos N. 2000. Temporal variations of surface regional background ozone over Crete Island in southeast Mediterranean. *Journal of Geophysical Research*: 105, 4399-4407.
- Kramell R., Miersch O., Schneider G., Wasternack C. 1999. Liquid Chromatography of Jasmonic Acid Conjugates. *Chromatographia*: 49, 42-46.
- Kramer D.M., Johnson G., Kiirats O., Gerald E.E. 2004. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research*: 79, 209-218.
- Krause G.H. e Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*: 42, 313-349.
- Kronfuß G., Polle A., Tausz M., Havranek W.M. e Wieser G. 1998. Effects of ozone and mild drought stress on gas exchange, antioxidants and chloroplast pigments in current-year needles of young Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *Trees*: 12, 482-489.

- Kubo A., Saji H., Tanaka K., Kondo N. 1995. Expression of Arabidopsis cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide. *Plant Molecular Biology*: 29, 479-489.
- Kyparissis A., Petropoulou Y. e Manetas Y. 1995. Summer survival of leaves in a soft-leaved shrub (*Phlomis fruticosa* L., Labiatae) under Mediterranean field conditions: avoidance of photoinhibitory damage through decreased chlorophyll contents. *Journal of Experimental Botany*: 46, 1825-1831.
- Laisk A., Kull O., Moldau H. 1989. Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. *Plant Physiology*: 90, 1163-1167.
- Landolt W., Günthardt-Georg M., Pfenninger I., Einig W., Hampp R., Maurer S., Matyssek R. 1997. Effects of fertilization on ozone-induced changes in the metabolism of birch (*Betula pendula*) leaves. *New Phytologist*: 137, 389-397.
- Langebartels C., Schraudner M., Ernst D., Heller W., Sandermann H. 2001. Oxidative stress and defence reactions in plants exposed to air pollutants and UV-B radiation. In: (D. Inzé, M. Van Montagu Eds.) *Oxidative stress in plants*, Taylor and Francis, London: 105-135.
- Langebartels C., Wohlgemuth H., Kschieschan S., Grun S., Sandermann H. 2002. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiology and Biochemistry*: 40, 567-575.
- Lefohn AS. 1992. Exposure-yield response relationships. In: (AS. Lefohn Ed.) *Surface level ozone exposures and their effects on vegetation*. Lewis Publishers, London: 236-239.
- Lefohn A.S., Shadwick D., Oltmans S.J. 2008. Characterizing long-term changes in surface ozone levels in the United States (1980-2005). *Atmospheric Environment*: 42, 567-575.
- Letchamo W., Xu H.L., Gosselin A. 1995. Photosynthetic potential of *Thymus vulgaris* selections under two light regimes and three soil water levels. *Scientia Horticulturae*: 62, 89-101.
- Levitt J. 1980. *Responses of plants to environmental stresses*. Academic Press, New York: 315 pp.
- Levy H. 1971. Normal atmosphere: Large radical and formaldehyde concentrations predicted. *Science*: 173, 141-143.
- Li Y. e Wanton D.C. 1990. Violaxanthin is an abscisic acid precursor in water-stressed dark-grown bean leaves. *Plant Physiology*: 92, 551-559.

- Lomonte C., Sgherri C., Baker A.J.M., Kolev S.D., Navari-Izzo F. 2010. Antioxidative response of *Atriplex condonocarpa* to mercury. *Environmental and Experimental Botany*: 69, 9-16.
- Long S.P. e Bernacchi C.J. 2003. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany*: 54, 2393-2401.
- Loranger G.I., Pregitzer K.S., King J.S. 2004. Elevated CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> concentrations differentially affect selected groups of the fauna in temperate forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*: 36, 1521-1524
- Lorenzini G., Nali C., Biagioni M. 1995. Long-range transport of photochemical ozone over the Tyrrhenian Sea demonstrated by a new miniaturized bioassay with ozone-sensitive tobacco seedlings. *The Science of the Total Environment*: 166, 193-199.
- Lorenzini G. e Nali C. 2005. *Le Piante e l'inquinamento dell'aria*. Sprinter-Verlag, Milano: 256 pp.
- Lütz C., Anegg S., Gerant D., Alaoui-Sossè B., Gérard J., Dizengremel P. 2000. Beech trees exposed to high CO<sub>2</sub> and simulated summer ozone levels: effects on photosynthesis, chloroplast components and leaf enzyme activity. *Physiologia Plantarum*: 109, 252-259.
- Maggio A., De Pascale S., Fagnano M., Barbieri G. 2011. Saline agriculture in Mediterranean environments. *Italian Journal of Agronomy*: 6, 36-43.
- Maggio A., Raimondi G., Martino A., De Pascale S. 2007. Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold. *Environmental Experimental Botany*: 59, 276-282.
- Mansfield T.A. e Pearson M. 1996. Disturbances in stomatal behaviour in plants exposed to air pollution. In: (Yunus M., Iqbal M. Eds.) *Plant response to air pollution*. Chichester, UK, John Wiley and Sons Ltd: 179-193.
- Martin M.J., Farage P.K., Humphries S.W., Long S.P. 2000. Can the stomatal changes caused by acute ozone exposure be predicted by changes occurring in the mesophyll? A simplification for models of vegetation response to the global increase in tropospheric elevated ozone episodes. *Australian Journal of Plant Physiology*: 27, 211-219.
- Matyssek R., Sandermann H., Wieser G., Booker F., Cieslik S., Musselman R., Ernst D. 2008. The challenge of making ozone risk assessment for forest trees more mechanistic. *Environmental Pollution*: 156, 567-582.
- Mauch-Mani B. e Mauch F. 2005. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*: 8, 409-414.

- McDowell J. e Dangl J. 2000. Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences*: 25, 79-82.
- McDowell N.G. 2011. Mechanisms Linking Drought, Hydraulics, Carbon Metabolism, and Vegetation Mortality. *Plant Physiology*: 155, 1051–1059.
- McKee D.J. 1993. Tropospheric ozone. Lewis Publishers, London: 223 pp.
- Mensuali-Sodi A., Panizza M., Tognoni F. 1992. Quantification of ethylene losses in different container-seal systems and comparison of biotic and abiotic contributions to ethylene accumulation in tissue cultures. *Physiologia Plantarum*: 84, 472-476.
- Merlot S. e Giraudat J. 1997. Genetic analysis of abscisic acid signal transduction. *Plant Physiology*: 114, 751-757.
- Mieda T., Yabuta Y., Rapolu M., Motoki T., Takeda T., Yoshimura K., Ishikawa T. e Shigeoka S. 2004. Feedback Inhibition of Spinach L-Galactose Dehydrogenase by L-Ascorbate. *Plant and Cell Physiology*: 45, 1271-1279.
- Mikkelsen T.N., Dodell B., Lütz C. 1995. Changes in pigment concentration and composition in Norway spruce induced by long-term exposure to low levels of ozone. *Environmental Pollution*: 87, 197-205.
- Moeder W., Barry C.S., Tauriainen A.A., Betz C., Tuomainen J., Utriainen M., Grierson D., Sandermann H., Langebartels C., Kangasjärvi J. 2002. Ethylene synthesis regulated by bi-phasic induction of ACC synthase and ACC oxidase genes is required for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. *Plant Physiology*: 130, 1918-1926.
- Mohanty J.G., Jaffe J.S., Schulman E.S., Raible D.G. 1997. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from activated human leukocytes using a dihyxyphenoxazine derivative. *Journal of Immunological Methods*: 202, 133-141.
- Moldau H., Sober J., Sober A., 1990. Differential sensitivity of stomata and mesophyll to sudden exposure of bean shoots to ozone. *Photosynthetica*: 24, 446-458.
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal Science Technologist*: 26, 211-219.
- Morgan P.B., Ainsworth E.A., Long S.P. 2003. How does elevated ozone impact soybean? A meta-analysis of photosynthesis, growth and yield. *Plant, Cell and Environment*: 26, 1317-1328.
- Mudd J.B. 1997. Biochemical basis for the toxicity of ozone. In: (M. Yunus, M. Iqbal Eds.) *Plant response to air pollution*. Wiley, New York: 267-284.

- Müller-Moulé P., Conklin P.L., Niyogi K.K. 2002. Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Physiology*: 128, 970-977.
- Müller-Moulé P., Golan T., Niyogi K.K. 2004. Ascorbate-deficient mutants of *Arabidopsis* grow in high light despite chronic photooxidative stress. *Plant Physiology*: 134, 1163-1172.
- Nakajima N., Matsuyama T., Tamaoki M., Saji H., Aono M., Kubo A., Kondo N. 2001. Effects of ozone exposure on the gene expression of ethylene biosynthetic enzymes in tomato leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*: 39, 993-998.
- Nali C., Paoletti E., Marabottini R., Della Rocca G., Lorenzini G., Paolucci A.R., Ciaffi M., Badiani M. 2004. Ecophysiological and biochemical strategies of response to ozone in mediterranean evergreen broadleaf species. *Atmospheric Environment*: 38, 2247-2257.
- Nali C., Francini A., Lazzerini E. Lorenzini G. Cioni P.L. 2006. Essential oils and volatile compounds in *Mentha spicata* plants exposed to phytotoxic ozone. *Acta Horticulture*: 723, 179-184.
- Nali C., Francini A., Lorenzini G. 2009. White clover clones as a cost-effective indicator of phytotoxic ozone: 10 years of experience from central Italy. *Environmental Pollution*: 157, 1421-1426.
- Nali C. e Lorenzini G. 2009. L'ozono, causa di gravi malattie alle piante. *Protezione delle colture* 2: 4-11.
- Neufelda H.S., Peoplesa S.J., Davisonb A.W, Chappelkac A.H., Somersc G.L., Thomley J.E, Bookere F.L. 2012. Ambient ozone effects on gas exchange and total non-structural carbohydrate levels in cutleaf coneflower (*Rudbeckia laciniata* L.) growing in Great Smoky Mountains National Park. *Environmental Pollution*: 160, 74-81.
- Nguyen N.T., Hiep N.D., Fujita K. 2005. Iron enhances aluminum-induced leaf necrosis and plant growth inhibition in *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant and Soil*: 277, 139-152.
- Ninga W., Peng X., Mad L., Cuia L., Lua X., Wangc J., Tiana J., Lia X., Wang W., Zhanga L. 2012. Enhanced secondary metabolites production and antioxidant activity in postharvest *Lonicera japonica* Thunb. in response to UV radiation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*: 13, 231-243.
- Niyogi K.K., Li X., Rosenberg V., Jung H. 2005. Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*: 56, 375-382.
- Noctor G. e Foyer C. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*: 49, 249-279.

- Nseyo U., Kim A., Stavropoulos N.E., Skalkos D. e Chung T.D. 2005. Differences of response of human bladder cancer cells to photodynamic therapy (PDT) with *Hypericum perforatum* L. extract and photofrin. Proceedings of the SPIE - The International Society for Optical Engineerin: 5689, 97-105.
- Okano K., Ito O., Takeba G., Shimizu A., Totsuka T. 1984. Alteration of <sup>13</sup>C-assimilate partitioning in plants of *Phaseolus vulgaris* exposed to ozone. New Phytologist: 97, 155-163.
- Okigbo R.N., Anuagasi C.L. e Amadi J.E. 2009. Advances in selected medicinal and aromatic plants indigenous to Africa. Journal of Medicinal Plants Research: 3, 86-95.
- Oliveira J.G., Alves P.L.C.A. Vitoria A.P. 2009. Alterations in chlorophyll a fluorescence, pigment concentrations and lipid peroxidation to chilling temperature in coffee seedlings. Environmental and Experimental Botany: 67, 71-76.
- Ormrod D.F. e Beckerson D.W. 1986. Polyamines as antiozonants for tomato. Horticultural Science: 21, 1070-1071.
- Örvar B.L., Mc Pherson J., Ellis B.E. 1997. Pre-activating wounding response in tobacco prior to high-level ozone exposure prevents necrotic injury. Plant Journal: 11, 203-212.
- Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R.L. 2001. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Journal of Agricultural and Food Chemistry: 49, 4619-4626.
- Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J., Deemer E.K., Prior R. L., e Huang D.J. 2002. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. Journal of Agricultural and Food Chemistry: 50, 2772–2777.
- Overmeyer K., Tuominen H., Kettunen R., Betz C., Langebartels C., Sandermann H., Kangasjärvi J. 2000. Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene an jasmonate signalling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. The Plant Cell: 12, 1849-1862.
- Overmeyer K., Brosché M., Kangasjärvi J. 2003. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. Trends in Plant Science: 7, 335-342.
- Ozturk A., Unlukara A., Ipek A. e Gurbuz B. 2004. Effect of salt stress and water deficit on plant growth and essential oil content of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Pakistan Journal of Botany: 36, 787-792.
- Pääkkönen E., Seppänen S., Holopainen T., Kokko H., Kärenlampi S., Kärenlampi L., Kangasjärvi J. 1998. Induction of genes for the stress proteins PR-10 and PAL in



- relation to growth, visible injuries and stomatal conductance in birch (*Betula pendula*) clones exposed to ozone and/or drought. *New Phytologist*: 138, 295-305.
- Paolacci A.R., D'Ovidio R., Marabottini R., Nali C., Lorenzini G., Abenavoli M.R., Badiani M. 2001. Ozone induces a differential accumulation of phenylalanine ammonia-lyase, chalcone synthase and chalcone isomerase RNA transcripts in sensitive and resistant bean cultivars. *Australian Journal of Plant Physiology*: 28, 425-428.
- Pasqualini S., Piccioni C., Reale L., Ederli L., Della Torre G., Ferranti F. 2003a. Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiology*: 133, 1122-1134.
- Pasqualini V., Robles C., Garzino S., Greff S., Bousquet-Melou A., Bonin G. 2003b. Phenolic compounds content in *Pinus halepensis* Mill. Needles: a bioindicator of air pollution. *Chemosphere*: 52, 239-248.
- Pastori G.M., Kiddle G., Antoni W., Bernard S., Veljovic-Jovanovic S., Verrier P.J., Noctor G., Foyer C.H. 2003. Leaf vitamin C modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signalling. *Plant Cell*: 15, 939-951.
- Pedranzani H., Sierra-de-Grado R., Vigliocco A., Miersch O., Abdala G. 2007. Cold and water stresses produce changes in endogenous jasmonates in two populations of *Pinus pinaster*. *Plant Growth Regulation*: 52, 111-116.
- Pell E., Eckardt N., Enyedi A.J. 1992. Timing of O<sub>3</sub> stress and resulting status of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase and associated net photosynthesis. *New Phytologist*: 120, 397-405.
- Pell E., Eckardt N.A., Glick R.E. 1994. Biochemical and molecular basis for impairment of photosynthetic potential. *Photosynthesis Research*: 39, 453-462.
- Pell E., Schlagnhauser C.D., Arteca R.N. 1997. Ozone-induced oxidative stress: mechanism of action and reaction. *Physiologia Plantarum*: 100, 264-273.
- Pellegrini E., Lorenzini G., Nali C. 2007. The 2003 European Heat Wave: Which Role for Ozone? Some Data from Tuscany, Central Italy. *Water, Air soil and Pollution*: 181, 401-408.
- Pellegrini E., Carucci M.G., Campanella A., Lorenzini G., Nali C. 2011a. Ozone stress in *Melissa officinalis* plants assessed by photosynthetic function. *Environmental and Experimental Botany*: 73, 94-101.
- Pellegrini E., Francini A., Lorenzini G., Nali C. 2011b. PSII photochemistry and carboxylation efficiency in *Liriodendron tulipifera* under ozone exposure. *Environmental and Experimental Botany*: 70, 217-226.

- Pellegrini E., Cioni P.L., Francini A., Lorenzini G., Nali C., Flamini G. 2012. Volatiles Emission Patterns in Poplar Clones Varying in Response to Ozone. *Journal of Chemical Ecology*: 38, 924-932.
- Pellinen R., Palva T., Kangasjärvi J. 1999. Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *The Plant Journal*: 20, 349-356.
- Peñarrubia L. e Moreno J. 1999. Molecular mechanisms of plant responses to elevated levels of tropospheric ozone. In: (M. Pessarakli Ed.) *Handbook of Plant Crop Stresses*, Dekker, New York: 769-794.
- Pereira W.E., de Siqueira D.L., Martinez C.A., Puiatti M. 2000. Gas exchange and chlorophyll fluorescence in four citrus rootstocks under Al stress. *Journal of Plant Physiology*: 157, 513-520.
- Petersen M. e Simmonds M.S.J. 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*: 62, 121-125.
- Pina M.J. e Moraes R.M. 2010. Gas exchange, antioxidant and foliar injuries in saplings of a tropical woody species exposed to ozone. *Ecotoxicology and Environmental Safety*: 73, 685-691.
- Pino M.E., Mudd J.B., Bailey-Serres J. 1995. Ozone-induced alterations of newly synthesized proteins in leaves of maize. *Plant Physiology*: 108, 777-785.
- Plazek A., Rapacz M. e Skoczowski A. 2000. Effects of ozone fumigation on photosynthesis and membrane permeability in leaves of spring barley, meadow fescue and winter rape. *Photosynthetica*: 38, 409-413.
- Pleijel H., Ojamerä K., Danielsson H., Sild E., Gelang J., Wallin G., Skärby L., Selldén G. 1997. Effects of ozone on leaf senescence in spring wheat: possible consequence for grain yield. *Phyton*: 37, 227-232.
- Pleijel H., Danielsson H., Emberson L. 2007. Ozone risk assesment for agricultural crops in Europe: Further development of stomatal flux and flux-response relationships for European wheat and potato. *Atmosphere and Environment*: 41, 3022-3040.
- Podila G.K., Paolacci A.R., Badiani M. 2001. The impact of greenhouse gases on antioxidants and foliar defense compounds. The impact of carbon dioxide and other greenhouse gases on forest ecosystems (In Karnosky D.F. Ceulemans R. Scarascia-Mugnozza G. Innes J.L. Eds.). CABI Publishing, New York: 57-125.
- Power S.A. e Ashmore M.R. 2002. Responses of fen and fen-meadow communities to ozone. *New Phytologist*: 156, 399-408.

- Radulović N., Lazarević J., Ristić N., Palić R. 2007. Chemotaxonomic significance of the volatiles in the genus *Stachys* (Lamiaceae): Essential oil composition of four Balkan *Stachys* species. *Biochemical Systematics and Ecology*: 35, 196-208.
- Rai V., Vajpayee P., Singh S.N., Mehrotra S. 2004. Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. *Plant Science*: 167, 1159-1169.
- Ranieri A., Castagna A., Soldatini G.F. 2000. Differential stimulation of ascorbate peroxidase isoforms by ozone exposure in sunflower plants. *Journal of Plant Physiology*: 56, 266-271.
- Ranieri A., Castagna A., Baldan B., Soldatini G.F. 2001a. Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. *Journal of Experimental Botany*: 354, 25-35.
- Ranieri A., Giuntini D., Ferraro F., Nali C., Baldan B., Lorenzini G., Soldatini G.F. 2001b. Chronic ozone fumigation induces alterations in thylakoid functionality and composition in two poplar clones. *Plant Physiology and Biochemistry*: 39, 999-1008.
- Ranieri A., Castagna A., Pacini J., Baldan B., Mensuali-Sodi A., Soldatini G.F. 2003. Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany*: 54, 2529-2540.
- Rao M.V. e Davis K.R. 1999. Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *The Plant Journal*: 17, 603-614.
- Rao M.V. e Davis K.R. 2001. The physiology of ozone-induced cell death. *Planta*: 213, 682-690.
- Rao M.V., Hale B.A., Ormond D.P. 1995. Amelioration of ozone-induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide. *Plant Physiology*: 109, 421-432.
- Rao M.V., Koch J., Davis K.R. 2000. Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. *Plant Molecular Biology*: 44, 345-358.
- Rao M.V., Lee H., Davis K.R. 2002. Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *The Plant Journal*: 32, 447-456.
- Raven P.H. 2002. *Biologia delle piante*. 6° Edizione. Zanichelli. Bologna.
- Razmuoo K., Heydarizadeh R., Sabzalianm M. 2008. Effect of salinity and drought stressed on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomile*. *International Journal of Agriculture and Biology*: 10, 451-454.
- Reddy G.N., Arteca R.N., Dai Y.R., Flores H.E., Negm F.B., Pell E. 1993. Changes in ethylene and polyamines in relation to mRNA levels of the large and small subunits of

- ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in ozone-stressed potato foliage. *Plant, Cell and Environment*: 16, 819-826.
- Reddy A.R., Chiatanya K.V., Vivekanandan M. 2004. Draught induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants *J. Plant Physiology*: 161, 1189-1202.
- Reichenauer T.G., Bolhàr-Nordenkamp H.R., Ehrlich U., Soja G., Postl W., Halbwachs G. 1997. The influence of ambient and elevated ozone concentrations on photosynthesis of *Populus nigra*. *Plant, Cell and Environment*: 20, 1061-1069.
- Rogers H.H., Prior S.A., Runion G.B., Mitchell R.J. 1996. Root to shoot ratio of crops as influenced by CO<sub>2</sub>. *Plant and Soil*: 187, 229-248.
- Rohacek K. 2002. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica*: 40, 13-29.
- Sander mann H. 1996. Ozone and plant health. *Annual Review of Phytopathology*: 34, 347-366.
- Sander mann H., Ernst D., Heller W., Langebartels C. 1998. Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends in Plant Science*: 3, 47-50.
- Sander mann H. e Matissek R. 2004. Scaling up from molecular to ecological processes. In: (H. Sander mann Ed.) *Molecular Ecotoxicology of Plants*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 207-226.
- Sanmartin M., Drogoudi P.D., Lyons T., Pateraki I., Barnes J., Kanellis A.K. 2003. Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta*: 216, 918-928.
- Scebba F., Pucciarelli I., Soldatini G.F., Ranieri A. 2003a. O<sub>3</sub>-induced changes in the antioxidant system and their relationships to different degrees of susceptibility of two clover species. *Plant Science*: 165, 583-593.
- Scebba F., Soldatini G.F., Ranieri A. 2003b. Ozone differentially affects physiological and biochemical responses of two clover species; *Trifolium repens* and *Trifolium pretense*. *Environmental Pollution*: 123, 209-216.
- Scebba F., Canaccini F., Castagna A., Bender J., Weigel H.J., Ranieri A. 2006. Physiological and biochemical stress responses in grassland species are influenced by both early-season ozone exposure and interspecific competition. *Environmental Pollution*: 142, 540-548.

- Schiffgens-Gruber A., Lutz C. 1992. Ultrastructure of mesophyll cell chloroplasts of spruce needles exposed to O<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub> and NO<sub>2</sub> alone and in combination. *Environmental and Experimental Botany*: 32, 243-254.
- Schlaginhauser C.D., Glick R.E., Arteca R.N., Pell E. 1995. Molecular cloning of an ozone-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase cDNA and its relationship with a loss of *rbcS* in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *Plant Molecular Biology*: 28, 93-103.
- Schneiderbauer A., Back E., Sandermann H., Ernst D. 1995. Ozone induction of extensin mRNA in Scots pine, Norway spruce and European beech. *New Phytologist*: 130, 225-230.
- Schraudner M., Moeder W., Wiese C., van Camp W., Inzé D., Langebartels C., Sandermann H. 1998. Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *The Plant Journal*: 16, 235-245.
- Schreiber U., Schliwa U., Bilger W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research*: 10, 51-62.
- Schuster B. e Retey J. 1995. The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: The role of prosthetic dehydroalanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A*: 92, 8433-8437.
- Sebastiani L., Scebba F., Tognetti R. 2004. Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoides* × *maximowiczii*) and I-214 (*P. × euramericana*) exposed to industrial waste Original Research Article. *Environmental and Experimental Botany*: 52, 79-88.
- Selmar D. e Kleinwächter M. 2012. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crops and Products*: 42, 558-566.
- Sembdner G. e Parthier B. 1993. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*: 44, 569-589.
- Severino J.F., Stich K., Soja G. 2007. Ozone stress and antioxidant substances in *Trifolium repens* and *Centurea jacea* leaves. *Environmental Pollution*: 146, 707-714.
- Sgarbi E., Baroni Fornasiero R., Paulino Lins A., Meneghini Bonatti P. 2003. Phenol metabolism differentially affected by ozone in two cell lines from grape (*Vitis vinifera* L.) leaf. *Plant Science*: 165, 951-957.

- Shana C. e Lianga Z. 2010. Jasmonic acid regulates ascorbate and glutathione metabolism in *Agropyron cristatum* leaves under water stress. *Plant Science*: 178, 130-139.
- Sharma Y.K. e Davis K.R. 1994. Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*: 105, 1089-1096.
- Sharma Y.K. e Davis K.R. 1997. The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biology and Medicine*: 23, 480-488.
- Sheng W.S., Chevone B., Hess J.L. 1993. Photosynthetic inhibition and superoxide dismutase activity in soybean cultivars exposed to short-term ozone fumigations. *Environmental Pollution*: 80, 45-52.
- Shin D.H., Jung S., Park S.J., Kim Y.J., Ahn J.M., Kim W. e Choi W. 2005. Characterization of thiol-specific antioxidant 1 (TSA1) of *Candida albicans*. *Yeast*: 22, 907-918.
- Shoji Y. e Nakashima H. 2004. Nutraceuticals and Delivery Systems. *Journal of Drug Targeting*: 12, 385-391
- Singh S., D. Kaur, Agrawal S.B., Agrawal M. 2010. Responses of two cultivars of *Trifolium repens* L. to ethylene diurea in relation to ambient ozone. *Journal of Environmental Sciences*: 22, 1096-1103.
- Soja G., Barnes J.D., Posch M., Vandermeiren K., Pleijel H., Mills G. 2000. Phenological weighting of ozone exposures in the calculation of critical levels for wheat, bean and plantain. *Environmental Pollution*: 109, 517-524.
- Solinas V. e Deiana S. 1996. Effect of water and nutritional condition on the *Rosmarinus officinalis* L., phenolic fraction and essential oil yield. *Rivista Italiana, EPPOS*: 19, 189-198.
- Spence R.D., Rykiel E.J., Sharpe P.J.H. 1990. Ozone alters carbon allocation in loblolly pine: assessment with carbon<sup>11</sup> labelling. *Environmental Pollution*: 64, 93-106.
- Spreitzer R.J. e Salvucci M.E. 2002. Rubisco: interactions, associations and the possibilities of a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology*: 53, 449-475.
- Surveswaran S., Cai Y.Z., Corke H e Sun M. 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*: 102, 938-953.
- Szalai G., Horgosi S., Soós V., Majláth I., Balázs E., Janda T. 2011. Salicylic acid treatment of pea seeds induces its *de novo* synthesis. *Journal of Plant Physiology*: 168, 213-219.
- Taarit M.B., Msaada K., Hosni K., Hammami M., Kchouk M.E., Marzouk B. 2010. Change in fatty acid and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under salt NaCl stress. *Acta Physiologiae Plantarum*: 32, 55-57.

- Tabatabaei S.J. 2008. Effects of cultivation systems on the growth. and essential oil content and composition of valerian. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*: 14, 54-67.
- Takabayashi J., Dicke M., Posthumus M.A. 1994. Volatile herbivore-induced terpenoids in plant-mite interactions: variation caused by biotic and abiotic factors. *Journal of Chemistry Ecology*: 20, 1329-1354.
- Tamaoki M., Matsuyama T., Kanna M., Nakajima N., Kubo A., Aono M., Saji H. 2003. Differential ozone sensitivity among *Arabidopsis* accessions and its relevance to ethylene synthesis. *Planta*: 216, 552-560.
- Tamaoki M., Freeman J.L., Pilon-Smits E.A.H. 2008. Cooperative ethylene and jasmonic acid signaling regulates selenate resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*: 146, 1219-1230.
- Tang Y., Chevone B.I., Hess J.L. 1999. Ozone-responsive proteins in a tolerant and sensitive clone of white clover (*Trifolium repens*). *Environmental Pollution*: 104, 89-98.
- Tanji K.K. 1990. Nature and extent of agricultural salinity. *Agricultural salinity assessment and management. ASCE Manuals and Reports on Engineering Practise No.71*, American Society of Civil Engineer, New York: 17 pp.
- Tausz M., Grulke N.E., Wieser G. 2007. Defense and avoidance of ozone under global change. *Environmental Pollution*: 147, 525-531.
- Telfer A., Dhami S., Bishop S.M., Philipps D., Barber J. 1994.  $\beta$ -carotene quenches singlet oxygen formed in isolated photosystem II reaction center. *Biochemistry*: 33, 14469-14474.
- Tingey D.T., Standley C., Field R.W. 1976. Stress ethylene evolution: a measure of ozone effects on plants. *Atmospheric Environment*: 10, 969-974.
- Torres Netto A., Campostrini E., de Oliveira J.G., Yamanishi O.K. 2002. *Brazilian Journal of Plant Physiology*: 14, 203-210.
- Trivellini A., Ferrante A., Vernieri P., Serra G. 2011. Effects of abscisic acid on ethylene biosynthesis and perception in *Hibiscus rosa-sinensis* L. flower. *Journal of Experimental Botany*: 62, 5437–5452.
- Troszyńska A. e Ciska E. 2002. Phenolic Compounds of Seed Coats of White and Coloured Varieties of Pea (*Pisum sativum* L.) and Their Total Antioxidant Activity. *Czech Journal of Food Sciences*: 20, 15-22.
- Tuominen H., Overmyer K., Keinänen M., Kollist H., Kangasjärvi J. 2004. Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in *Arabidopsis*. *Plant Journal*: 39, 59-69.

- Tuzet A., Perrier A., Loubet B., Cellier P. 2011. Modelling ozone deposition fluxes: The relative roles of deposition and detoxification processes. *Agricultural and Forest Meteorology*: 151, 480-492.
- Tzortzakis N., Borland A., Singleton I., Barnes J. 2007. Impact of atmospheric ozone-enrichment on quality-related attributes of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*: 45, 317-325.
- Vahala J., Schlagnhauer C.D., Pell E. 1998. Induction of an ACC synthase cDNA by ozone in light-grown *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiologia Plantarum*: 103, 45-50.
- Vernieri P., Perata P., Armellini D., Bugnoli M., Presentini R., Lorenzi R., Ceccarelli N., Alpi A., Tognoni F. 1989. Solid phase radioimmunoassay for the quantitation of abscisic acid in plant crude extracts using a new monoclonal antibody. *Journal of Plant Physiology*: 134, 441-446.
- Voltolina G. e Visentin L. 2001. La riproduzione delle piante officinali. *Erboristeria domani*. Luglio/Agosto: 24-34.
- Von Caemmerer S. e Farquhar G.D. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*: 153, 376-387.
- Walker-Simmons M. 1987. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiology*: 84, 61-66.
- Wang S.Y., Jiao H.J., Faust M. 1991. Changes in ascorbate, glutathione, and related enzyme activities during thidiazuron-induced bud break of apple. *Physiologia Plantarum*: 82, 231-236.
- Wang H., Cao G. e Prior R.L. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal Agricultural of Food Chemistry*: 44, 701-705.
- Wang K.L.C., Li H., Ecker J.R. 2002. Ethylene biosynthesis and signalling networks mediating responses to stress. *Plant Cell*: 14, S131-S151.
- Weber H., Chetelat A., Reymond P., Farmer E.E. 2004. Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *The Plant Journal*: 37, 877-888.
- Weiss J. 1935. Investigation on the radical HO<sub>2</sub> in solution. *Transactions of the Faraday Society*: 31, 668-681.
- Weitzel C. e Petersen M. 2010. Enzymes of phenylpropanoid metabolism in the important medicinal plant *Melissa officinalis* L. *Planta*: 232, 731-742.
- Wellburn F.A.M. e Wellburn A.R. 1994. Atmospheric ozone affects carbohydrate allocation and winter hardiness of *Pinus halepensis*. *Journal of Experimental Botany*: 45, 607-614.



- Wellburn F.A.M. e Wellburn A.R. 1996. Variable patterns of an antioxidant protection but similar ethylene emission differences in several ozone-sensitive and ozone-tolerant plant selections. *Plant Cell and Environment*: 19, 754-760.
- Wen P.F., Chen J.Y., Kong W.F., Pan Q.H., Wan S.B., Huang W.D. 2005. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Science*: 169, 928-934.
- Wieser G. e Matyssek R. 2007. Linking Ozone Uptake and Defense towards a Mechanistic Risk Assessment for Forest Trees. *New Phytologist*: 174, 7-9.
- Williams A. e Barry B. 2004. Penetration enhancers. *Advertising of Drug Delivery Review*: 56, 603-618.
- Wolfenden J. e Mansfield T.A. 1991. Physiological disturbances in plants caused by air pollutants. *Proceedings of Royal Society, Edinburgh*: 98, 117-138.
- Wohlgemuth H., Mittelstrass K., Kschieschan S., Bender J., Weigel H.J., Overmyer K., Kangasjärvi J., Sandermann H., Langebartles C. 2002. Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant, Cell and Environment*: 25, 717-726.
- Wu Y. e Tiendemann A. 2002. Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone. *Environmental Pollution*: 116, 37-47.
- Xua S., Lia J., Zhangb X., Weia H., Cuia L. 2006. Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. *Environmental and Experimental Botany*: 56, 274-285.
- Yamamoto H.Y. e Bassi R. 1996. Carotenoids: localization and function. In: (Ort D.R. e Yocum C.F. Eds.) *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers: 539-563 pp.
- Zaki M.F., Abou-Hussein S.D., Abou El-Magd M.M., El-Abagy H.M.H. 2009. Evaluation of some sweet fennel cultivars under saline irrigation water. *European Journal of Science Research*: 30, 67-78.
- Zar J.H. 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Englewood, UK.
- Zgòrka G. e Główniak K. 2001. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*: 26, 79-87.

- Zhang X.L., Ren Y.J., Zhao J. 2008. Roles of extensins in cotyledon primordium formation and shoot apical meristem activity in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Experimental Botany* 59, 4045-4058.
- Zheljazkov V.D., Yankuloff Y., Raev R., Stanev S., Margina A. e Kovatcheva N. 1996. Achievements in breeding on medicinal and aromatic plants in Bulgaria. In F. Pank, eds. *Proceedings of the International Symposium: Breeding Research in Aromatic and Medicinal Plants*. Quedlinburg, Germany: 142-145.
- Zheng X.M., Resnick R.J. e Shalloway D. 2000. A phosphotyrosine displacement mechanism for activation of Src by PTP. *Embo Journal*: 19, 964-978.
- Zhou Z., Robards K., Halliwell S., Blanchard C. 2004. The distribution of phenolic acids in rice. *Food Chemistry*: 87, 401-406.
- Ziaková A., Brandsteterová E., Blahová E. 2003. Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*. *Journal of Chromatography*: 983, 271-275.
- Zouzoulas D., Koutroubas S.D., Vassiliou G., Vardavakis E. 2009. Effects of ozone fumigation on cotton (*Gossypium hirsutum* L.) morphology, anatomy, physiology, yield and qualitative characteristics of fibers. *Environmental and Experimental Botany*: 67, 293-303.

## 6. APPENDICE

- %D: Eccesso di energia dissipato in forma fotochimica
- %P: Eccesso di energia dissipato sotto forma di calore
- %X: (1- %D - %X)
- $\cdot\text{O}_2^-$ : anione superossido
- 4CL: 4cinnamoyl:coenzima A sintetasi
- A: antheraxantina
- ABA: acido abscissico
- $A_{\max}$ : attività fotosintetica massima
- AOT40: *accumulated exposure over a threshold*
- APS: ammonio persolfato
- AsA/ ASA+DHA: stato *redox* dell'acido ascorbico
- AsA: acido ascorbico (forma ridotta)
- ASA+DHA: acido ascorbico totale
- BR: brassinosteroidi
- BSA: albumina bovina
- CAT: catalasi
- CE: conducibilità Elettrica
- $C_i$ : concentrazione intercellulare di  $\text{CO}_2$  nella camera sottostomatica
- CO: monossido di carbonio
- Curve A/ $C_i$ : relazione tra capacità fotosintetica e  $C_i$ , misurata a concentrazioni crescenti di  $\text{CO}_2$  esterna (ppm)
- Curve Luce: relazione tra capacità fotosintetica e radiazione luminosa, misurata a intensità crescenti di radiazione luminosa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
- DEPS: indice di deossidazione
- DHA: acido deidroascorbico
- ET: etilene
- ETR: ritmo di trasporto elettronico apparente
- $F'_m$ : fluorescenza massimo centri di reazione aperti
- $F'_0$ : fluorescenza minima centri di reazione aperti
- $F_0$ : minimo valore di fluorescenza
- $F_m$ : massimo valore di fluorescenza
- $F_v$ : fluorescenza variabile ( $F_v = F_m - F_0$ )
- $F'_v$ : fluorescenza variabile ( $F'_v = F'_m - F'_0$ )
- $F_v/F_m = [(F_m - F_0)/F_m]$ : efficienza fotochimica del PSII nello stato adattato al buio
- $F_v/F_0 = [(F_m - F_0)/F_0]$ : efficienza fotochimica del PSII nello stato adattato al buio
- $F'_v/F'_m = [(F'_m - F'_0)/F'_m]$ : efficienza fotochimica del PSII nello stato adattato alla luce
- FUI: Farmacopea Ufficiale Italiana
- GLV: *Green leaf volatiles*
- GPX: glutathione perossidasi
- GSG + GSH: glutathione totale
- GSH/GSSG: stato *redox* glutathione
- GSH: glutathione ridotto
- GSSG: glutathione ossidato
- $G_w$ : conduttanza stomatica
- HORAC: *Hydroxyl radical absorbance capacity*
- $\text{H}_2\text{O}_2$ : acqua ossigenata
- HR: risposta ipersensibile
- JA: acido jasmonico

- $J_{\max}$ : massimo ritmo di trasporto elettronico a luce saturante
- LHCI: complesso antenna del PSI
- LHCII: complesso antenna del PSII
- MHA: acido monoidroascorbico
- NO: monossido di azoto
- NO<sub>2</sub>: biossido di azoto
- O: ossigeno monoatomico
- O•: ossigeno singoletto
- O<sub>2</sub>: ossigeno molecolare
- O<sub>3</sub>: ozono
- OH•: radicale idrossilico
- OMS: Organizzazione Mondiale della Sanità
- ORAC: *Oxygen radical absorbance capacity*
- PAL: fenilalanina ammonio-liasi
- POD: perossidasi specifiche
- POX: perossidasi aspecifiche
- PF: peso fresco
- PS: peso secco
- PSI: fotosistema I
- PSII: fotosistema II
- RuBisCO: ribulosio-1,5bisfosfato carbossilasi/ossigenasi
- RuBp: ribulosio-1,5bisfosfato
- Q<sub>A</sub>: accettore primario del PSII
- q<sub>NP</sub>: *quenching* non fotochimico
- q<sub>P</sub>: *quenching* fotochimico
- Q<sub>red</sub>/Q<sub>tot</sub>: frazione ridotta o chiusa dei centri di reazione del PSII
- RAS: acido rosmarinico sintasi
- R<sub>d</sub>: ritmo di respirazione mitocondriale diurno
- RNS: specie reattive dell'azoto
- *Root:shoot ratio*: rapporto porzione ipogea:epigea
- ROS: specie reattive dell'ossigeno
- RWC: contenuto idrico relativo
- SA: acido salicilico
- SAR: resistenza sistemica acquisita
- SLA: area fogliare specifica
- SOD: superossido dismutasi
- TBA: acido tiobarbiturico
- TCA: acido tricloroacetico
- V: violaxantina
- VAZ: contenuto totale in xantofille (V+A+Z)
- V<sub>cmax</sub>: velocità massima di carbossilazione della RuBisCO
- VOC: composti organici volatili
- WUE<sub>i</sub>: efficienza d'uso dell'acqua
- Z: zeaxantina